

**Untersuchungen zur Funktion der
Acetylcholinesterase im sarkoplasmatischen
Retikulum des Skelettmuskels**

Claus-Jürgen Mayer

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548314_0034

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Direktor: Professor Dr. med. K. Kramer

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTION DER ACETYLCHOLINESTERASE
IM SARKOPLASMATISCHEN RETIKULUM DES SKELETTMUSKELS

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claus-Jürgen M a y e r

aus

München

Jahr

1970

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Oberstarzt Privatdozent

Dr. G. Ulbrecht

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. K. Kramer

Dekan: Prof. Dr. med. dent.

E. Kraft

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 7. 1970



Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Einleitung	1
B Experimenteller Teil	10
I Untersuchung des Einflusses des ACh- AChE-Systems auf die Calcium-Permea- bilität von Präparationen des sarko- plasmatischen Retikulum.	
1. Gewinnung des sarkoplasmatischen Re- tikulum	11
2. Herstellung glycerinextrahierter Binzelfasern	12
3. Versuchsanordnung	12
Milieubedingungen der Versuchsbäder	13
4. Ergebnisse	20
IIa Wirkung von ACh und Ca^{++} auf kalium- depolarisierte, Ca^{++} -verarmte Ske- lett-muskelfaserbündel der Maus	22
1. Mechanische Versuchsanordnung	23
2. Milieubedingungen der Versuchsbäder	27
3. Ergebnisse	32
IIb Bestimmung des Membranpotentials von Skelettmuskelfasern der Maus während der unter IIa beschriebenen Milieubedingung	39

	Seite
1. Versuchsanordnung	39
2. Ergebnisse	43
 III	
Die Wirkung von AChE - Inhibi- toren auf die Kontraktionskraft denervierter Warmblüterskelett- muskeln	45
1. Gewinnung denervierter Skelett- muskelpreparate	46
2. Versuchsanordnung	47
3. Ergebnisse	50
 C	
Diskussion der Ergebnisse	59
 D	
Zusammenfassung	78
Literaturverzeichnis	81
Lebenslauf	90

A

Einleitung

Die Frage nach der Kopplung von Erregung und Kontraktion stellt gegenwärtig eines der zentralen Probleme der Muskelphysiologie dar. Während der Mechanismus der Erregungsübertragung an der motorischen Endplatte, wo es durch quantenhafte Freisetzung von Acetylcholin zu einer raschen Permeabilitätsänderung für Natrium- und Kaliumionen kommt, weitgehend als geklärt angesehen werden darf (55), sind die Vorgänge bei der Erregungsausbreitung von der Membranoberfläche in die Tiefe der Muskelfaser noch unbekannt. Nach A.V. Hill (39, 40) kann dies bei durchschnittlichen Faserstärken von 60 bis 100 μ nicht durch Diffusion eines Stoffes, sondern nur durch einen viel rascheren - z.B. elektrischen - Prozeß erfolgen. Die Wiederentdeckung des sarkoplasmatischen Retikulum und sorgfältige elektronenmikroskopische Studien, zunächst durch Porter und Pallade (88), danach durch A.F. Huxley (49) und Peachey (84, 85, 86) und viele andere, führte zu der Vermutung, daß der theoretisch zu fordernde elektrische Prozeß über den T - Apparat des sarkoplasmatischen Retikulum in die Tiefe der Faser geleitet werden könnte. A.F. Huxley und Taylor (48) konnten zeigen, daß bei Reizung mit Mikroelektroden in der Z - Linie, (hier münden

beim quergestreiften Muskel des Frosches die Kanälchen des transversalen Apparates an die Membranoberfläche) eine symmetrische, lokale Kontraktion an der Skelettmuskelfaser erzeugt werden konnte. Sie zogen daraus den Schluß, daß der transversale Apparat in der Lage ist, durch elektrische Depolarisation seiner Membran, die Erregung des Sarkolems von der Oberfläche in die Tiefe zu leiten. Diese Vermutung wurde bestätigt durch Untersuchungen von Natori und Isojima (82), sowie von Costantin und Podolsky (14), die bei Reizung in der Z - Linie einer in Paraffinöl vom Sarkolemm befreiten Skelettmuskelfaser eine lokale Kontraktion zweier Halbsarkomeren nachweisen konnten.

Elektronenmikroskopisch stellt sich der transversale Apparat als ein den Muskel senkrecht zu seiner Achse durchziehendes, kontinuierliches Kanälchensystem dar, das allerdings auch kurze Strecken longitudinal verlaufen kann, mit einem Durchmesser von $750 \text{ \AA}$ in der Nähe der Faseroberfläche, der sich allmählich auf $260 \text{ \AA}$ verringert. Die Kontinuität dieses Kanälchensystems wurde von H.E. Huxley (51) durch Inkubation von Skelettmuskelfasern mit Ferritin, von Endo (25) mit fluoreszierendem Rhodamin B und von D.K. Hill (41) mit radioaktiv markiertem Albumin nachgewiesen. Damit konnten die Autoren zugleich zeigen, daß dieses Schlauchsystem mit dem Extrazellulärraum kommuniziert.

In sehr engem Kontakt mit den transversalen Tubuli stehen die terminalen Zisternen. Nach Peachey sind 80 % der Oberfläche des T - Apparates von den Membranen der terminalen Zisternen bedeckt. Aus den Arbeiten von H.E. Huxley, Endo und D.K. Hill geht hervor, daß die oben genannten makromolekularen Stoffe vom T - Apparat nicht in die terminale Zisterne eindringen können, jedoch ist es, wie Costantin und Mitarbeiter (14, 15) zeigen konnten, möglich, durch Ausfällen mit Oxalat in den terminalen Zisternen gespeichertes Calcium elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen. Terminale Zisterne und T - Apparat werden wegen ihrer deutlichen strukturellen Zuordnung im Bereich der Z - Scheibe gemäß der Definition von Porter und Pallade (88) als Triade bezeichnet.

Auffallend ist der elektronenmikroskopische Befund, daß bei schnellen Muskeln ein verzweigtes T - System sichtbar wird, während langsame Muskeln nur vereinzelt spärlich entwickelte tubuläre Schläuche aufweisen. Dies läßt vermuten, daß durch Dichte und Anzahl der Zisternen und der daraus resultierenden kürzeren oder längeren Diffusionswege für Calciumionen die Geschwindigkeit der Kontraktion bestimmt wird. Die Fähigkeit des sarkoplasmatischen Retikulum, Calcium zu speichern, ist seit der Entdeckung von Marsh(69) über die Fähigkeit von Extrakten aus Skelettmuskelbrei, sowohl glycerin-extrahierte Fasermoleküle zur Erschlaffung zu bringen, als

auch die Superpräzipitation von Aktomyosinpräparationen trotz der Gegenwart von ATP zu verhindern, eingehend untersucht worden. Portzehl (90) fand 1957, daß dieser von Marsh gefundene Erschlaffungsfaktor an die sogenannten Muskelgrana gebunden war. 1961 fanden Ebashi (22) und Hasselbach und Makinose(34), daß sarkoplasmatische Vesikel in der Lage sind, mit der Energie aus ATP Calcium zu speichern und die Calciumaußenkonzentration von 10^{-5} auf Werte unter 10^{-7} M zu senken. Weber, Herz und Reiss (111) haben gezeigt, daß das Calciumionen akkumulierende sarkoplasmatische Retikulum in der Lage ist, die Calciumionenkonzentration im Myoplasma so weit zu senken, daß die Calcium-aktivierten Prozesse der ATP - Spaltung durch die Aktomyosin-ATPase, die ATP - getriebene Superpräzipitation von Aktomyosingelen und die ATP - induzierte Kontraktion von extrahierten Fasernmodellen nicht mehr stattfinden. Aus diesen Befunden muß geschlossen werden, daß die Kontraktion mit großer Wahrscheinlichkeit durch den Calciumentzug aus dem fibrillären Raum beendet wird. Der Muskel erschlafft.

Durch intracelluläre Mikroinjektion von Calciumchlorid gelingt es, wie Heilbrun und Wiercinsky (38), Niedergerke (83) und Caldwell (7) zeigen konnten, lokale Kontraktionen hervorzurufen. Die Calciumchloridkonzentrationen, die dazu verwendet werden mußten, waren jedoch mit 0,2 bis 1 mM recht hoch. Neuere Untersuchungen von

Portzehl, Caldwell und Rüegg (91) und Portzehl, Zaoralek und Grüder (92) mit Calcium-EGTA- Komplexen an der lebenden Riesenmuskelfaser von Maja Squinado zeigen jedoch, daß die zur Aktivierung des Aktomyosins notwendige freie Calciumionenkonzentration bei 10^{-5} M liegt. Nach Peachey beträgt das Volumen der terminalen Zisternen, der intermediären Zisternen und des longitudinalen Apparates mit dem gefensterten Kragen jeweils 4 bis 5 % des gesamten Faservolumens. Wenn man hypothetisch eine Calciumionenkonzentration im Vesikelinneren von 10^{-3} M annimmt, würde die zur Aktivierung des Aktomyosins notwendige Calciumkonzentration von 10^{-5} M erreicht werden, wenn man sich vorstellt, daß alle Vesikel schlagartig für Calcium permeabel werden. Der T - Apparat hingegen stellt nur einen Volumenanteil von 0,3 % des Gesamtfaservolumens dar. Herrschte im Lumen des T- Apparates eine $[Ca^{++}]$ vor, die dem Extracellulärraum entspricht (~ 1 mM), würde die $[Ca^{++}]$ auf 3×10^{-6} M absinken, wenn durch Permeabilitätsänderung seiner Membran eine Gleichverteilung aller Calciumionen in der Muskelfaser zustande käme. Diese $[Ca^{++}]$ reicht nicht aus, das Aktomyosin voll zu aktivieren. (Peachey, 85, 86).

Autoradiographische Untersuchungen von Winegrad (113, 114, 115) mit Calcium⁴⁵ am Skelettmuskel des Frosches

zeigten eine Schwärzung des Films 0,2 bis 0,3 μm beiderseits der Z-Linie, wenn der Muskel nach genügender Inkubation mit Calcium⁴⁵ in Ruhe fixiert wurde. Wurde jedoch der Muskel einer Kaliumkontraktur unterworfen und in kontrahiertem Zustand fixiert, so war die Schwärzung deutlich über dem A-Band zu sehen.

Auch aus diesen Versuchen wird geschlossen, daß Calcium in den terminalen Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulum gespeichert und bei Erregung des Muskels aus diesen freigegeben wird, so daß es durch Diffusion an den Ort seiner aktivierenden Wirkung gelangen kann.

Bei der Suche nach Stoffen, die die Vesikelmembran reversibel so verändern, daß sie plötzlich die akkumulierten Ca^{++} freigegeben, fand Nagai (80), daß isolierte Vesikel ihre erschlaffende Wirkung auf das extrahierte Fasernmodell in Gegenwart von ATP durch Coffein verlieren. Frank (30) konnte an Einzelfasern des Frosches zeigen, daß Coffein in der Lage ist, unabhängig von den Potentialverhältnissen am Sarkolemm, d.h. auch bei hohen Kaliumkonzentrationen im Extracellulärraum und vollständiger Abwesenheit von Calciumionen, am Skelettmuskel eine Kontraktur hervorzurufen.

Caldwell (8) gelang es, durch intracelluläre Injektion von Coffein in die Riesenmuskelfaser von Maja Squinado

Kontrakturen zu erzeugen. Definitionsgemäß waren die Kontrakturen sowohl in den Versuchen von Frank als auch von Caldwell reversibel. Nach den Untersuchungen von Carsten und Mommaerts (9) hemmt Coffein die Calciumpumpe des SPR. Wenn man annimmt, daß durch Coffein die in gewissen Grenzen bestehende Permeabilität der Vesikelmembran für Ca^{++} nicht verändert würde, könnte man die Versuche von Nagai, Frank und Caldwell so interpretieren, daß die Calciumionen, dem Konzentrationsgefälle folgend, in den interfibrillären Raum diffundieren. Die durch Coffein gehemmte Calciumpumpe ist nicht in der Lage, das Konzentrationsgefälle der Calciumionen zwischen intrazisternalem und extrazisternalem, myoplasmatischen Raum aufrechtzuerhalten.

Es ist in hohem Maße unwahrscheinlich, daß Coffein oder coffeinartige Stoffe bei der natürlichen Erregung und Kontraktion im Muskel frei wird und durch Einwirkung auf die Membran der terminalen Zisternen - sei es durch Permeabilitätserhöhung für Ca^{++} , sei es durch Hemmung der Calciumpumpe - diese für die gespeicherten Calciumionen durchgängig macht. Diese Coffeinversuche deuten auf ein stoffliches Prinzip bei der Ankopplung der Kontraktion an die Erregung im Sinne einer "elektro-sekretorischen Kopplung". Der freigesetzte "Kopplungsstoff" befreit die

Myosin-ATPase-Aktivatoren aus ihrem Depot.

Für eine solche elektrisch stimulierte Sekretion bestehen bekannte Beispiele: die motorische Endplatte, die neuro-neuralen Synapsen und die Medulla der Nebenniere. Der sezernierte Stoff ist das Acetylcholin. Diese Hypothese kann durch die Befunde von Ulbrecht und Kruckenberg (101) gestützt werden, die 1965 Acetylcholinesteraseaktivität im SPR des Skelettmuskels nachwiesen. Aus den von diesen Autoren ermittelten kinetischen Daten muß geschlossen werden, daß es sich um strukturgebundene Acetylcholinesterase handelt. Die Fermentaktivität [$\text{mol} \times \text{Min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \times \text{N}$] war, verglichen mit dem Gesamthomogenat, im SPR achtmal höher.

Einzelfasern des Kaninchenpsoas zeigten lichtmikroskopisch bei histochemischer Lokalisation der Acetylcholinesterase nach Couteaux und Taxi (18) in endplattenfernen Bereichen parallel zur Querstreifung angeordnete Kupfersulfidkörnchen. Diese Körnchen sind über dem ganzen Faserquerschnitt zu finden und fehlen bei Vorbehandlung der Faser mit 10^{-5} M DFP (Di-iso-propylfluorophosphat). Ulbrecht und Kruckenberg fragen nach der funktionellen Bedeutung der im SPR nachgewiesenen Acetylcholinesterase. Aus den oben dargelegten Analogien erscheint die Annahme nicht unerlaubt, daß in dem Prozess der elektrisch

stimulierten Calciumfreisetzung aus den terminalen Zisternen das Acetylcholin-Acetylcholinesterase-System einbezogen ist. Die durch dieses System hervorgerufene Permeabilitätsänderung für Ionen in den verschiedenen erregbaren Strukturen ist eine vom Arbeitskreis Nachmansohn vertretene und in vielen Punkten auch erwiesene Grundkonzeption.

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen histochemischer Präparate fand Karnowsky (53) AChE in den terminalen Zisternen des Herzmuskels, W.G. van der Kloot (104) im SPR aus Krebsmuskeln.

Die von diesem Autor mitgeteilte Calcium-Akkumulation wurde durch 50 μ M Physostigmin und DFP zuvor beeinträchtigt, aber nicht aufgehoben. Die Untersuchungen sind jedoch nicht quantitativ auswertbar. Sie stützen aber qualitativ unsere Überlegungen.

Inzwischen hat Mommaerts (74) bestätigt, daß auch er im SPR Cholinesterase gefunden hat.

Es besteht deshalb das Bedürfnis, einen Anhalt für die funktionelle Bedeutung der Acetylcholinesterase im SPR zu gewinnen.

B Experimenteller Teil

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist:

- I. Die Untersuchung des Einflusses des Acetylcholin-Acetylcholinesterase-Systems auf die Calcium-Permeabilität von Präparationen des sarkoplasmatischen Retikulum.

- II. Die Erfassung der Wirkung von Acetylcholin und Calcium auf Skelettmuskelfaserbündel der weißen Maus, die unter Calcium-Mangel durch Kaliumchlorid depolarisiert wurden und wegen des Fehlens der Ca^{++} dabei nicht oder sehr wenig kontrahieren.

- III. Die Messung der Kontraktionskraft des quergestreiften denervierten Warmblüterskelettmuskels (M. gracilis ant. der weißen Maus) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Acetylcholinesterase-Inhibitoren.

I. Untersuchung des Einflusses des Acetylcholin-Acetylcholinesterase-Systems auf die Calcium-Permeabilität von Präparationen des sarkoplasmatischen Retikulum.

Methoden

Das sarkoplasmatische Retikulum wurde nach M.Ulbrecht (103) bereitet. Ein Kaninchen wurde getötet und nach vollständigem Ausbluten wurden die Muskeln von Rücken und Hinterläufen entfernt und in eisgekühltes destilliertes Wasser gelegt. Die Muskelstücke wurden zweimal im Fleischwolf zerkleinert. Danach wurde der Muskelbrei unter Zusatz von etwa der dreifachen Menge des eingewogenen Muskelgewichtes einer Lösung, die 0,1 M KCl, 5 mM Phosphatpuffer pH 7 und 5×10^{-4} M EDTA (EDTA = Äthylendiaminotetraessigsäure) enthielt, im MSE - Homogenisator homogenisiert. Das Homogenat wurde in einer MSE - Zentrifuge Typ High Speed 18 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Während des gesamten Arbeitsvorganges wurde die Temperatur unter 4°C gehalten. Mit einem Aliquot der SPR - Präparation wurde die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl durchgeführt.

Zur Herstellung der glycerinextrahierten Fasern nach Szent György (95) wurden vom Psoas des Kaninchens nach Eintritt der Totenstarre Faserbündel von 0,5 bis 1 mm Durchmesser entnommen und in Extraktionslösung bei 0°C zwölf Stunden extrahiert. Die Extraktionslösung enthielt 50 % Glycerin, 0,01 M Phosphatpuffer pH 7 und 0,002 M Cystein. Die extrahierten Fasern wurden dann bis zur Verwendung in reinem Glycerin bei -18°C aufbewahrt. Die Fasern verloren auch nach über dreiwöchiger Lagerung nicht ihre Kontraktionsfähigkeit. Die 10 bis 12 mm langen Einzelfasern, mit Durchmessern zwischen 40 und 60 μm , wurden unter einem binokularen Präpariermikroskop auf einem tiefgeköhlten Glasprisma präpariert und auf ein Tensiometer nach A. Weber (109) in der Modifikation nach Portzehl (89) aufgeleimt. Der Leim bestand aus in Aceton gelöstem Polypropylen und trocknete in einer Minute. Die Versuche wurden bei Zimmertemperatur (20 - 22°C) in 4 ml fassenden Plexiglasgefäßen durchgeführt. Die isometrischen Spannungen wurden fotokymographisch registriert. Der Badwechsel beanspruchte jeweils nur 3 bis 5 Sekunden.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung A enthielt 30 mM KCl, 20 mM Histidinchlorid pH 7,0 , 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA (EGTA = Äthylen~~g~~lykol-bis- (β -amino-äthyläther)-N,N,N',N' - tetraessigsäure) eingestellt auf pH 7,0 .

In dieser Lösung wurden alle Fasern zu Beginn des Versuches mindestens drei Minuten gebadet, um die Calciumkonzentration weit unter die Schwellenkonzentration für die Kontraktion zu senken.

Lösung B war die eigentliche Versuchslösung. Sie bestand aus 30 mM KCl, 5 mM ATP eingestellt auf pH 7,0 , 5 mM $MgCl_2$ und 20 mM Histidinchlorid eingestellt auf pH 7,0 .

Die Vesikelpräparation wurde so zugegeben, daß der Eiweißgehalt der Lösung 1 mg Stickstoff pro Milliliter betrug.

Für jede Vesikelpräparation wurde die individuelle Calciumkapazität bestimmt, d.h. es wurde solange $CaCl_2$ zur SPR - Suspension zugegeben, bis die extravesikuläre Calciumionenkonzentration die kritische Calciumionenkonzentration überschritt. Als Indikator für das Überschreiten der kritischen Calciumionenkonzentration diente die Kontraktion eines Fasermodells. Die Calcium-

kapazität der verwendeten Granasuspensionen lag zwischen 0,1 und 0,15 μ Mole/mg x N

Lösung C enthielt 30 mM KCl, 5 mM ATP eingestellt auf pH 7,0, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA mit 20 mM Histidinchlorid auf pH 7,0 eingestellt.

Mit dieser Lösung wurde die Erschlaffungsfähigkeit des Fasermodells geprüft.

Lösung D ist das Kontraktionsbad. Es enthielt 30 mM KCl, 5 mM ATP eingestellt auf pH 7,0, 5 mM $MgCl_2$ und 20 mM Histidinchlorid auf pH 7,0 eingestellt. Der pH wurde grundsätzlich mit der Glaselektrode eingestellt.

Nachdem die Faser drei Minuten in Lösung A gebadet worden war, wurde sie in Lösung B eingetaucht und eine Minute beobachtet. Bei intakten Calcium-gefüllten sarkoplasmatischen Vesikeln wurde in Gegenwart von ATP keine Spannungsentwicklung gemessen. Bei Ausbleiben der Kontraktion wurde dem Versuchsbad Acetylcholin in ansteigender Konzentration (0,8 - 130 mM) zugegeben.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Grana mit DFP (0,0-Di-isopropyl-fluor-phosphat) in einer Konzentration von 10^{-5} M 30 Minuten präinkubiert. Danach ist die Acetylcholinesterase vollständig gehemmt. Dies zeigt die Abb. 1, in der bereits bei einer [DFP] von ca. 10^{-6} Mol/l der ACh-Umsatz null wird.

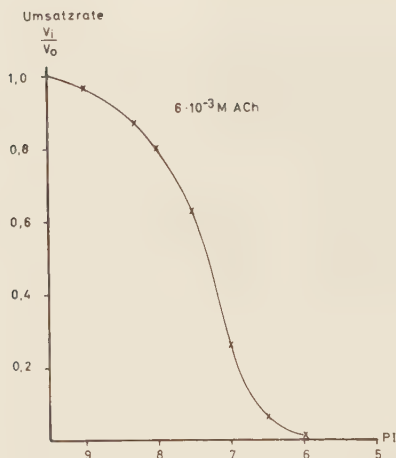


Abb. 1 Hemmung des Acetylcholinumsatzes vom Gesamthomogenat aus äußeren Augenmuskeln des Kaninchens nach 30 Minuten Präinkubation in DFP.

Abszisse: negativer Log. der DFP-Konzentration

Ordinate: Grad der Hemmung, wobei v_i die DFP-gehemmte und v_o die ungehemmte Umsatzgeschwindigkeit angibt.

Substratkonzentration 6×10^{-3} M Acetylcholin

Milieubedingungen: 0,09 M KCl, 0,06 M NaCl, 0,04 M $MgCl_2$,
pH 7,0 37 °C

Elektrotitrimetrische Kontrolle des durch NaOH-Zugabe konstant gehaltenen pH.

Drittens wurden die Grana mit Bw 284 c 51 (1,5 bis-(N-allyl-N,N-dimethyl-4-ammoniumphenyl)pentan-3 on-dibromid) in einer Konzentration von 10^{-4} präinkubiert.

Bw 284 c 51 hemmt in dieser Konzentration die Acetylcholinesterase vollständig und selektiv. Die Abhängigkeit des ACh-Umsatzes von der Hemmstoffkonzentration ist in Abb. 2 gezeigt.

Die selektive AChE-Hemmung durch Bw 284 c 51 ist bekannt. Deshalb wird die nicht hemmbare Restaktivität bei den $[Bw\ 284\ c\ 51] \gg 3 \times 10^{-6}\ M$ auf ACh-Hydrolyse durch unspezifische ChE bezogen.

Wenn diese "Restspaltung" von der Gesamtspaltung abgezogen wird, resultiert die errechnete Kurve, (siehe Abb. 2).

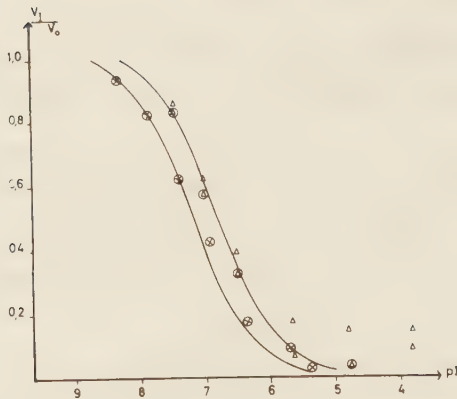


Abb. 2 Hemmung des Acetylcholin-Umsatzes vom Gesamthomogenat aus Kaninchenmuskeln Δ — Δ , Hemmung des ACh-Umsatzes bei der Grana-Präparation $\odot$ — $\odot$ und errechnete Kurve für das Gesamthomogenat nach Subtraktion der Butyrylcholin-Spaltung $\bullet$ — $\bullet$ durch Bw 284 c 51

Abszisse: negativer Log. der Inhibitorkonzentration

Ordinate: Grad der Hemmung, wobei v_1 die durch Bw284 c 51 gehemmte und v_0 die ungehemmte Umsatzgeschwindigkeit angibt. Milieubedingungen wie in Abb. 1

Die Präinkubationsdauer betrug fünf Minuten. Auch hier wurde nach Eintauchen der Faser in die Inhibitor enthaltende Lösung B eine Minute beobachtet. Danach wurde schrittweise 0,8 bis 130 mM ACh dem Versuchsbad zugegeben.

In einer vierten Versuchsreihe wurden die sarkoplasmatischen Vesikel mit dem kompetitiven ACh-Rezeptor-Antagonisten Succinylcholin 8 mM präinkubiert.

Unter Beobachtung der Faserspannung während einer Minute wurde die AcetylcholinKonzentration schrittweise auf Werte von 0,8 - 130 mM gesteigert.

Bei jeder der vier Versuchsreihen, die jeweils aus 5 bis 10 Einzelversuchen bestanden, diente das Kontraktionsbad D zur Kontrolle der erhaltenen Kontraktionsfähigkeit der Faser. Diesem war die jeweils in Lösung B verwendete Menge Acetylcholin, DFP, Bw 284 c 51 bzw. Succinylcholin zugesetzt.

Alle Fasern zeigten in der Kontrolle ihre volle Kontraktionsfähigkeit.

Ergebnisse

1. Maximal mit Calcium beladene Vesikel geben bei Einwirkung von Acetylcholin auch in hohen Konzentrationen (130 mM) das gespeicherte Calcium nicht in der für die Aktivierung des Fasermodells notwendigen Menge frei.
2. Präinkubation des Versuchsbades mit DFP in einer Konzentration von 10^{-5} M führt bei dreißigminütiger Dauer nicht zum Verlust der Calciumspeicherfähigkeit der Suspension des sarkoplasmatischen Retikulum.
3. Zugabe von Acetylcholin in die mit DFP präinkubierte Vesikelsuspension führte nicht zu einer Freisetzung von Calcium in der zur Kontraktion ausreichenden Menge.
4. Nach Eintauchen der Faser in die mit Bw 284 c 51 präinkubierte Vesikelsuspension zeigte sich keine Kontraktion. Auch die Zugabe von Acetylcholin bis zu einer Endkonzentration von 130 mM brachte das Fasermodell nicht zur Kontraktion, beeinträch-

tigte also die Ca-Speicherfähigkeit nicht.

5. Zugabe von Succinylcholin in das Bad B bewirkte keine Veränderung der Membrandurchlässigkeit für Calcium in dem für die Aktivierung der Faser notwendigen Maße. Die zusätzliche Gabe von Acetylcholin bis zu einer Konzentration von 130 mM bewirkte ebenfalls keine Kontraktion.

6. Bei allen Kontrollversuchen in Lösung D zeigten die extrahierten Fasern einen unbeeinflussten Spannungsanstieg. Dabei war dem Kontraktionsbad D 130 mM Acetylcholin, 0,01 mM DFP, 0,1 mM Bw284c51 oder 17,5 mM Succinylcholin zugesetzt.

IIa Erfassung der Wirkung von Acetylcholin und Calcium in vitro auf Skelettmuskelfaserbündel der weißen Maus, die durch Kaliumchlorid depolarisiert wurden und durch vorherigen Entzug von Calcium eine erheblich beeinträchtigte Kaliumkontraktur zeigten.

Acetylcholin vermag in geeigneten Konzentrationen nicht nur den Endplattenbereich, sondern nach Fleckenstein (27) sogar das gesamte Sarkolemm zu depolarisieren.

Fleckenstein fand ein Absinken des Verletzungsruhepotentials bei $[ACh] > 5 \times 10^{-3} M$.

Als Folge dieser Depolarisation zeigt der Muskel eine Kontraktur. Will man die mögliche Wirkung von Acetylcholin in der Tiefe der Muskelfaser untersuchen, so ist es erstens nötig, die schon bekannten Wirkungen von Acetylcholin auf den Skelettmuskel wie Depolarisation der Membran und damit verbundene Kontraktur zu verhindern. Dies wurde erreicht, indem die Membranen der Faserbündel nach Vorbehandlung in calciumfreiem Milieu mit einer calciumfreien Lösung, deren Kaliumkonzentration 101,43 mM betrug, depolarisiert wurden.

Zweitens sollte durch Wahl hoher Acetylcholin- und Calciumkonzentrationen ein möglichst rasches Eindringen

dieser Stoffe über die transversalen Tubuli in die Tiefe der Muskelfasern erzielt werden.

Methoden

Die Untersuchungen wurden an Muskelbündeln des *M. gracilis ant.* der weißen Maus durchgeführt. Es wurden ca. 20 gr schwere weibliche NMRI - Mäuse verwendet.

Nachdem die Maus durch einen Genickschlag getötet worden war, wurde der *M. gracilis ant.* entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, daß der Muskel selbst nicht mit den Präparierwerkzeugen in Berührung kam. Mit einem Scherenschlag wurde das os pubis vom Becken abgetrennt und das dem Muskel anhaftende Bindegewebe zur Tibia hin abpräpariert. Die Tibia wurde im Gelenkspalt vom Femur getrennt und etwas distal des Ansatzes des *M. gracilis ant.* mit der Schere durchschnitten. Der Muskel konnte nun zwischen Ursprungs- und Ansatzknochen gehalten und aufgehängt werden. Während der Präparation wurde fortwährend eine Krebs-Henseleit-Lösung von Zimmertemperatur auf das Operationsgebiet geträufelt, um eine Schädigung oberflächlicher Fasern durch Austrocknung zu vermeiden.

Der so gewonnene Muskel hatte eine Ruhelänge von ca.

18 mm und einen elliptischen Querschnitt mit einem großen Durchmesser von 1,2 mm und einem kleinen Durchmesser von 0,8 mm. Der Muskel wurde sodann in einer Plexiglasschale an zwei V 2 A-Stahlhaken horizontal aufgehängt. In der Schale kann der Muskel beliebig gespannt und um seine Längsachse gedreht werden. Die in der Präparierschale befindliche Krebs-Henseleit-Lösung wurde ständig durch frisch hinzufließende Lösung von Zimmertemperatur erneuert.

Unter einem binokularen Präpariermikroskop wurden nun Faserbündel mit einem feinen Iris-Skalpell abgetrennt, bis ein Faserbündel mit einem Querschnitt von ca. 0,1 bis 0,2 mm² zurückblieb. Die genaue Stärke des Faserbündels wurde am Ende eines jeden Versuches festgestellt, indem die beiden Durchmesser unter einem Mikroskop mit geeichter Okularstrichplatte fünfmal gemessen und aus den gewonnenen Mittelwerten der Faserquerschnitt nach der Formel

$$Q = \frac{d_1 \times d_2 \times \pi}{4}$$

errechnet werden konnte.

(d_1 = großer Durchmesser der Ellipse,
 d_2 = kleiner Durchmesser der Ellipse).

Das Faserbündel wurde am Spannungsmeßgerät mit Hilfe von zwei Platinhaken senkrecht aufgehängt und auf ca. 125 % seiner Ruhelänge gedehnt. Der fixierte untere Haken diente zugleich als direkte Elektrode zur tetanischen Reizung. Der obere Haken war mit Hilfe eines dünnen Naturseidenfadens mit einem Torsionsband, an dem ein Spiegel zur optischen Registrierung der Spannung fixiert war, verbunden. Die Registrierung der entwickelten Spannung erfolgte mit Hilfe eines Lichtzeigers photokymographisch. Der maximale Zeigerausschlag am Kymographen betrug 10 cm und die Länge des Lichtzeigers 115 cm.

Der Quotient $\frac{10}{115} = 0,087 = \sin 2 \alpha \approx \sin 5^\circ$

läßt in erster Näherung die Berechnung des registrierbaren Torsionswinkels α zu. Der am Torsionsband angebrachte Kraftarm konnte in seiner wirksamen Länge variiert werden. Er hatte bei größter Empfindlichkeitseinstellung eine Länge von 5 mm. Aus dieser Länge und dem Torsionswinkel läßt sich die maximale registrierbare Verkürzung L des Faserbündels berechnen.

$$L = \sin \alpha \times 5 \text{ mm}$$

Hieraus errechnet sich eine größtmögliche Verkürzung von 0,22 mm. Die Länge der verwendeten Faserbündel betrug in gespanntem Zustand 22 bis 24 mm. Die Längenänderung lag also maximal bei 1 % der Faserlänge. Die gemessenen Kontraktionen wurden deshalb als isometrisch angesehen. Das Badegefäß faßte 100 ml Lösung und bestand aus zwei senkrechten Glasrohren von 30 mm Durchmesser, die durch zwei waagrechte Rohre von 12 mm lichter Weite so miteinander verbunden waren, daß die im System befindliche Flüssigkeit durch den mittels Gasdurchströmung verursachten Auftrieb zirkulieren konnte. Der Boden der vertikalen Gefäße und die Verbindungsrohre verliefen ausreichend geneigt, damit sie mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe sehr rasch völlig entleert werden konnten. In das eine Rohr wurde eine Glasfritte mit Filtereinsatz G 1 zur Versorgung der Lösungen mit Carbogen (95 Vol.% O₂ und 5 Vol.% CO₂) gehängt. Diese ständige Gasdurchströmung bewirkte zugleich die schnelle und gleichmäßige Verteilung zugegebener Substanzen. Im anderen Rohr befand sich das Muskelpräparat. Die räumliche Trennung des in der Badelösung befindlichen Muskels von der Begasung war vorteilhaft, weil keine Irritation des Meßvorganges durch aufsteigende oder platzende Gasblasen eintreten konnte. Beide Rohre waren von einem Wasserbad umgeben, dessen Temperatur mit Hilfe

eines Thermostaten konstant eingestellt werden konnte. Während des Versuchs wurde beständig frische Lösung in einer Menge von 5 ml/Min. zugeführt. Das Badevolumen wurde durch Absaugen überschüssiger Lösung von der Oberfläche mit einer Wasserstrahlpumpe konstant gehalten. Calciumfreie Lösungen wurden in einer Menge von 10 ml/Min zugeführt, so daß alle zehn Minuten das Volumen des gesamten Bades nachgeflossen war.

Als Lösungen wurden verwendet:

Lösung A Lösung nach den Vorschriften von Krebs und Henseleit (59,61) mit zusätzlich 1/1000 IE Insulin pro Milligramm Glukose.

Lösung B Diese Lösung hatte die gleiche Zusammensetzung wie Lösung A, jedoch wurde das Calciumchlorid weggelassen und durch eine äquivalente Glucoselösung ersetzt. Nach Frank (30) wurde 2×10^{-5} M d-Tubocurarin zugesetzt, um Membranreaktionen auf den Calciumentzug zu unterdrücken.

Lösung C Bei dieser Lösung wurde das Natriumchlorid der Krebs-Henseleit-Lösung durch Kaliumchlorid ersetzt. Die so erzielte Kaliumionenkonzentration betrug 101,43 mM und reichte aus, die Erregbarkeit der Muskelmembran auszuschalten.

Eine weitere Erhöhung der Kaliumionenkonzentration ginge zu Lasten der Isotonie. Auch in Lösung C war das Calciumchlorid durch die entsprechende Menge isotoner Glucoselösung ersetzt.

Die fest installierten Zuflußleitungen aus Silikon-schlauch wurden nach jedem Versuch 15 Minuten lang mit kochendem destillierten Wasser durchspült.

Nach der Präparation wurde jedes Faserbündel eine Stunde bei 37°C in Lösung A gebadet und dann die bei maximaler tetanischer Reizung erhaltene Spannung registriert.

Zur elektrischen Reizung wurden zwei Platinelektroden verwendet, von denen eine, als Haken ausgebildet, den Muskel fixierte. Die andere tauchte als indifferente Elektrode in die Lösung ein. Die elektrischen Reize wurden von einem Rechteckreizgerät der Firma Tönnies erzeugt. Als tetanischer Reiz mit maximaler mechanischer

Antwort wurde für den *M. gracilis* ant. der Maus eine 1 Sekunde währende Serie von 150 Rechteckimpulsen mit je 1 msec. Dauer gefunden.

Nach der Spannungsregistrierung wurde das Badegefäß geleert und Glaswände, Fritte und Muskel sorgfältig mit frisch zulaufender calciumfreier Lösung (Lösung B) abgespült, die sofort wieder abgesaugt wurde. Das Entleeren, Spülen und Wiederauffüllen des Gefäßes dauerte 15 sec. Die calciumfreie Lösung wurde ständig erneuert und zwar so, daß pro Minute etwa 10 ml frische Lösung zugeführt wurde. Das Muskelbündel wurde solange in calciumfreier Lösung gebadet, bis sich eine deutliche Verminderung der Spannungsentwicklung bei tetanischer Reizung bemerkbar machte. Daraufhin erfolgte die Depolarisation der Muskelmembran durch 101,43 mM K^+ der Lösung C.

Drei Minuten nach der Kaliumdepolarisation wurde in der ersten Versuchsreihe die Calciumionenkonzentration auf 10 mM eingestellt. Dies entspricht der vierfachen Calciumionenkonzentration der Krebs-Henseleit-Lösung. Drei Minuten nach der Calciumzugabe wurde in der Badelösung eine AcetylcholinKonzentration von 0,1 M hergestellt. Das verwendete Acetylcholin lag als Chlorid vor. Der die Lösung ständig durchperlende Gasstrom sorgte für eine rasche und vollständige Durchmischung.

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die beiden Substanzen drei Minuten nach der Kaliumdepolarisation in umgekehrter Reihenfolge zugegeben: zuerst 0,1 M ACh, sodann nach drei weiteren Minuten 10 mM Ca.

Da die Zugabe von Acetylcholin in der oben genannten Konzentration das Milieu hypertonisch macht, wurden entsprechende Kontrollen durchgeführt. Dabei wurde Acetylcholin durch KCl in der gleichen Osmolarität ersetzt. Die Kaliumionenkonzentration wurde also auf 201 mM gesteigert.

Bei zwei Versuchen wurde, nachdem der Muskel seine stärkste Kontrakturspannung erreicht hatte, das Bad rasch entleert und mit einer modifizierten Lösung C, die 0,1 M ACh, 10^{-3} M EGTA, jedoch kein Calcium enthielt, wiederaufgefüllt.

Um eine mögliche Beeinflussung der beobachteten Acetylcholinwirkung durch Hemmung der Acetylcholinesterase des sarkoplasmatischen Retikulum zu untersuchen, wurde bei einem Versuch der Lösung B (calciumfrei) und der Lösung C (kaliumreich) 10^{-6} M DFP zugegeben.

Zur Prüfung, ob der Muskel durch die hohe Acetylcholin-konzentration oder durch die hypertonische Lösung geschädigt worden war, wurde die Lösung C aus dem Badegefäß entfernt und das Faserbündel 1 Stunde in Lösung A (Normallösung) gebadet. Danach wurde die Spannung bei tetanischer Reizung und die Spannung der Kaliumkontraktur durch erneuten Badewechsel mit Lösung C (Kaliumbad) gemessen.

Der pH der Badelösungen wurde während eines jeden Versuchs wiederholt bestimmt und hielt sich konstant zwischen 7,3 und 7,4 .

Ergebnisse

1. Kaliumdepolarisierte Muskelbündel des *M. gracilis* ant. der weißen Maus entwickeln Kontrakturen nach Calcium- und Acetylcholinzugabe. Sie sind in den Abb. 3,4 und 5 wiedergegeben. Dabei sind die Werte aus den Originalregistrierungen herausgenommen und über einer gerafften Zeitabszisse aufgetragen. Dies war aus darstellungstechnischen Gründen erforderlich, denn der Zeitbedarf für einen Versuch machte die Wiedergabe im Original unmöglich.

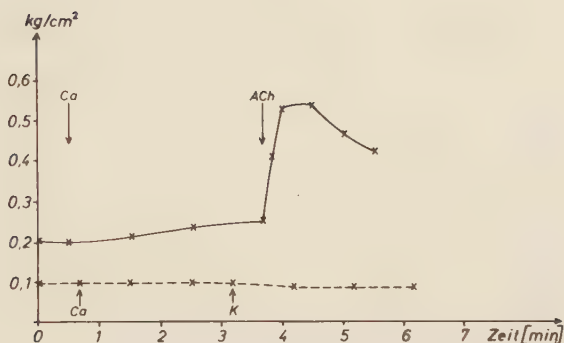


Abb. 3 ACh-stimulierte Kontraktur in Calcium-Gegenwart.

Faserbündel des *M. gracilis* ant. der Maus.

Querschnitt $0,12 \text{ mm}^2$

Vorbehandlung: 45 Min. Ca-verarmt in Lösung B (Ca-frei)
und anschließender Depolarisation in Lösung C

(101,43 mval K^+)

↓ Ca = Zugabe von CaCl_2 , $[\text{Ca}^{++}]$ im Bad 10 mM

↓ ACh = Zugabe von AChCl , $[\text{AChCl}]$ im Bad 100 mM

x-----x Kontrollversuch mit gleicher Osmolarität

↑ K = Zugabe von KCl , $[\text{K}^+]$ im Bad 201,43 mM.

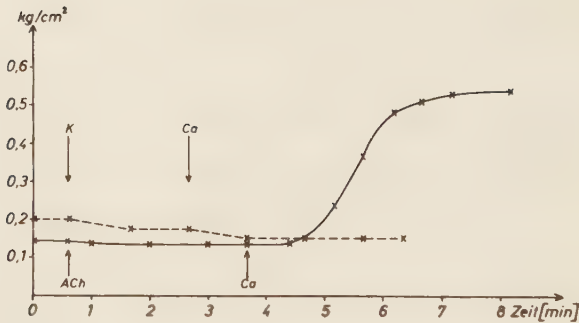


Abb. 4 ACh-stimulierte Kontraktur in Calcium-Gegenwart.

Faserbündel des *M. gracilis* ant. der Maus.

Querschnitt $0,14 \text{ mm}^2$

Vorbehandlung: 45 Min. Ca-verarmt in Lösung B (Ca-frei)
und anschließender Depolarisation in Lösung C ($101,43 \text{ mval K}^+$)

↑ ACh = Zugabe von AChCl, [AChCl] im Bad 100 mM

↑ Ca = Zugabe von CaCl_2 , $[\text{Ca}^{++}]$ im Bad 10 mM

x----x Kontrollversuch, bei dem statt AChCl KCl zugefügt wurde.

K = Zugabe von KCl, $[\text{K}^+]$ im Bad $201,43 \text{ mM}$

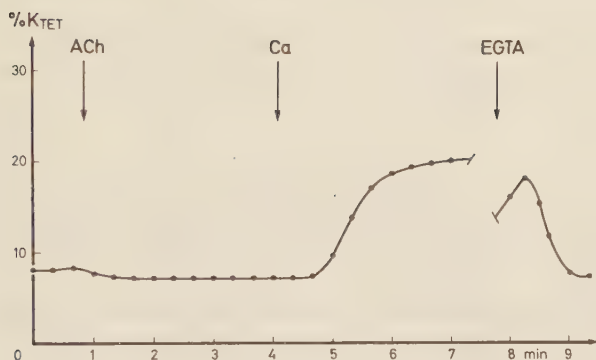


Abb. 5 ACh-stimulierte Kontraktur in Calcium-Gegenwart und anschließender Erschlaffung durch EGTA.

Faserbündel des *M. gracilis* ant. der Maus.

Vorbehandlung: 45 Min. Ca-verarmt in Lösung B (Ca-frei) und anschließender Depolarisation in Lösung C (101,43

mval K⁺)

↓ ACh = Zugabe von AChCl, [AChCl] im Bad 100 mM

↓ Ca = Zugabe von CaCl₂, [Ca⁺⁺] im Bad 10 mM

↓ EGTA = mechanische Registrierung durch Entleeren des Badegefäßes unterbrochen. Wiederauffüllen des Badegefäßes mit Lsg. C + 100 mM AChCl + 1×10^{-3} M EGTA

Abszisse: Zeit in Min.

Ordinate: isometrische Spannungsentwicklung in %, der bei maximaler tetanischer Reizung registrierten Spannung.

Tabelle 1

Vorbehandlung	<u>Latenzzeit</u> nach Zugabe von Lösung 4 der Spalte 1 (Min.)	<u>Gipfelzeit</u> nach Zugabe von Lösung 4 der Spalte 1 (Min.)	<u>Kontrakturgipfel</u> in % der tetanischen Spannung bei L = 1,25 L ₀
1	2	3	4
1. Ca-verarmt	1,37	3,33	8,1
2. depolarisiert (101,43 mM KCl)	1,01	2,77	10,0
3. AChCl (100mM, 3 Min.)	1,27	3,70	12,6
4. CaCl ₂ (10 mM)	0,77	3,97	22,7
	0,5	1,0	9,3
	0,67	3,06	20,0
	1,33	4,56	22,5
	0,53	1,05	15,2
	0,37	4,6	22,0
Mittelwert	0,87 ± 0,39	3,12 ± 1,37	15,8 ± 6,1
1. Ca-verarmt	0	0,83	13,4
2. depolarisiert (101,43 mM KCl)	0	0,2	9,6
3. CaCl ₂ (10mM, 3Min)	0	0,47	22,0
4. AChCl (100 mM)	0	0,93	16,5
	0	0,63	20,8
	0	0,62	25,0
	0,07	0,35	26,0
	0,08	0,4	20,8
	0,11	0,55	14,2
	0,13	0,53	19,6
Mittelwert	0,039 ± 0,038	0,55 ± 0,22	18,8 ± 5,2

2. In den durch Acetylcholin und Calcium hervorgerufenen Kontrakturen werden nur 16 bzw. 19% der bei tetanischer Reizung erreichten Maximalspannung erzielt.
3. Acetylcholinzugabe in calciumhaltiger Lösung bewirkt einen sofortigen Spannungsanstieg. Der Mittelwert aus elf Versuchen beträgt für die Zeit von der Acetylcholinzugabe bis zum Erreichen der maximalen Kontrakturspannung 32 sec. Dies zeigt die Tabelle 1 .
4. Acetylcholinzugabe in calciumfreier Lösung bewirkt dagegen keinen Spannungsanstieg. Wird 3 Min. nach der ACh-Zugabe dem Bade CaCl_2 (10 mMol/l) zugesetzt, zeigt sich ein deutlich verzögerter Spannungsanstieg. Der Mittelwert der Latenz der verzögerten Kontraktion aus neun Versuchen, bei denen Calcium nach dreiminütiger Vorinkubation mit 0,1 M AChCl zugegeben wurde, beträgt 52 sec., Latenz- und Gipfelzeit zusammen sogar 187 sec.
5. 10 mMol/l Ca^{++} allein bewirkt in dem beobachteten Zeitraum von 3 Min. keine Spannungserhöhung.

6. Die Kontrakturen sind reversibel. Die am Ende der Versuche nach einer Verweildauer von 1 Stunde in Normallösung gemessene Spannungsentwicklung auf tetanischen Reiz zeigt nur einen durchschnittlichen Spannungsabfall von 5% gegenüber der zu Beginn der Versuche gemessenen Spannung.
7. Die erzeugten Kontrakturen beruhen nicht auf osmotischen Effekten. Äquimolarer Ersatz des AChCl durch KCl bleibt ohne mechanische Wirkung.
8. EGTA (1 mMol/l) führt in Gegenwart von ACh und Ca^{++} aus der Kontraktur zur Erschlaffung.
9. Durch Präinkubation eines Faserbündels in 10^{-6} M DFP für die Dauer von 100 Min. kann die durch Ca^{++} und AChCl hervorgerufene Kontraktur nicht unterdrückt werden.

II b Membranpotentialbestimmung an Skelettmuskelfasern des M. plantaris der Maus während der unter II a beschriebenen Milieubedingungen.

Methoden

Die Potentialmessungen wurden nach der von Hodgkin und Horrowicz (43) beschriebenen Methode durchgeführt. Der Widerstand der Glasmikroelektroden betrug 10 - 30 M Ω . Der Eingangswiderstand der beiden Vorverstärker mit Feldeffekttransistoreingang war $> 10^{11} \Omega$. Die elektrischen Signale wurden in einem Tektronix-Oszillographen von einem Schwarzer-Direktschreiber aufgezeichnet. Es wurden nur solche Potentialänderungen ausgewertet, die durch einen plötzlichen Potentialsprung einen "glatten" Einstich erkennen ließen und die sich während der intracellulären Messung konstant verhielten.

Die Potentialänderungen konnten mittels eines "wobbelbaren" Tonfrequenzgenerators über einen NF - Verstärker und Lautsprecher akkustisch überwacht werden. Ein korrekter Einstich erzeugte einen plötzlichen Tonfrequenzabfall.

Als Badegefäß diente das von Hodgkin und Horrowicz (43) beschriebene Gefäß in der Modifikation nach Lüttgau

und Lobsiger (63). Der Vierwegehahn wurde über Vertikalbohrungen ständig von den temperierten und oxygenierten Lösungen durchströmt. Zur Umwälzung verwendeten wir Kunststoffkreiselpumpen mit einer Leistung von ca. 1 Ltr./Min. Die Temperatur im Badegefäß wurde auf 36°C eingestellt und ihre Konstanz mittels eines Thermistors überwacht.

Der frisch entnommene *M. plantaris* wurde mit V 2 a - Nadeln an seinem sehnigen Ursprung und Ansatz auf PVC - Blöckchen horizontal in der Rinne der Versuchskammer aufgespannt. Potentialmessungen wurden nur an den Fasern vorgenommen, die sich auf der Oberfläche des Muskels befanden.

Tabelle 2

Reihenfolge der Vorbe- handlung, Zeit [Min.]	Meß- milieu			Gemessenes Membran- potential [mV] (Mittelwert)	Standard- abweichung (s)	Zahl der Muskel- präparate	Zahl der Messungen
	A	B	C				
			C ₁				
			C ₂				
60	-	-	-	-76,22	4,38	23	397
60	15	-	-	-60,24	5,71	23	464
60	15	3	-	-15,28	4,08	22	232
60	15	3	3	-16,63	3,77	19	223
60	15	3	-	-15,39	1,15	4	78
60	15	3	3	-21,06	4,88	13	217
60	15	3	-	-17,03	0,31	4	130
60	15	3	3	-11,22	1,24	4	83
60	15	3	3	-18,34	2,88	1	27
60	15	3	3	-18,27	2,48	1	27

Erläuterungen zu Tabelle 2

<u>Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
A	Krebs-Henseleit (Normal)
B	Krebs-Henseleit (Ca-frei)
C	Ca-freie Lsg. mit 101,43 mVal/l K^+ , 45,5 mVal/l Na^+ Übrige Ionen gegenüber normaler Krebs- Henseleit-Lsg. unverändert.
C ₁	Lösung C + 10 mMol/l $CaCl_2$
C ₂	Lösung C + 0,1 Mol/l AChCl
C ₃	Lösung C + 10 mMol/l $CaCl_2$ + 0,1 Mol/l AChCl
C ₄	Lösung C + 10 mMol/l $CaCl_2$ + 0,1 Mol/l KCl
C ₅	Lösung C + 10 mMol/l $CaCl_2$ + 0,1 Mol/l Trischlorid
C ₆	Lösung C + 10 mMol/l $CaCl_2$ + 0,1 Mol/l NH_4Cl

Ergebnisse

1. Nach einstündiger Verweildauer in normaler Krebs-Henseleit-Lösung wurde an 23 Skelettmuskelfasern des M. plantaris der Maus aus 397 Einzelmessungen ein mittleres Membranpotential von 76 mV gefunden.
2. Nach 15-minütiger Verweildauer in Ca-freier Krebs-Henseleit-Lösung zeigten die Faser einen Potentialabfall von 16 mV auf -60 mV.
3. Nach einminütiger Verweildauer in einer Lösung, in der die $[K^+]$ 101,43 mVal/l beträgt, sank das Membranpotential bis auf 15,3 mV ab. Dies wurde mit 232 Messungen an 22 Präparaten festgestellt.
4. Die in Ca^{++} -freiem Milieu durch 101,43 mVal/l KCl auf -15,3 mV depolarisierten Fasern ändern das verstellte Potential nur geringfügig, wenn 10 mMol/l $CaCl_2$ zugegeben werden. Von 15,3 mV heben 10 mMol/l $CaCl_2$ das Potential auf 16,6 mV an. Diese Potentialverschiebung ist jedoch nicht statistisch signifikant.
Zugabe von 100 mMol/l AChCl zur kaliumdepolarisierten

Faser verändert den Depolarisationsgrad nicht, wenn Ca^{++} fehlen. Dagegen nimmt das Membranpotential um 4,5 mV von -16,6 auf -21,1 mV zu, wenn 0,1 Mol/l AChCl einer kaliumdepolarisierten Faser in Gegenwart von 10 mMol/l CaCl_2 zugefügt wird.

5. Wird in Ca-Gegenwart die $[\text{KCl}]$ von 101,43 mMol/l auf 201 mMol/l erhöht, sinkt das Membranpotential von -16,6 auf -11,2 mV ab.
6. Durch Erhöhen der $[\text{Cl}^-]$ von 105 mÄqu/l auf 205 mÄqu/l steigt das durch 101,43 mMol/l KCl auf -16,6 mV gesenkte Membranpotential auf -21,1 mV an, wenn die über die Normalkonzentration hinausgehende $[\text{Cl}^-]$ aus AChCl stammt. Es beträgt -18,3 mV, wenn die zusätzliche $[\text{Cl}^-]$ von Tris-Cl oder NH_4Cl stammt.

III. Untersuchungen über die Abhängigkeit der Kontraktionskraft des quergestreiften denervierten Warmblütermuskels (*M. gracilis* ant. der Maus) von der Konzentration von AChE - Inhibitoren.

In dieser Versuchsreihe wurde geprüft, ob die AChE des SPR funktionell unmittelbar an der Kopplung von Erregung und Kontraktion beteiligt ist. Ist dies der Fall, so wäre eine Änderung der mechanischen Antwort des denervierten Muskels auf direkten tetanischen Reiz in Hinblick auf den zeitlichen Verlauf oder die Höhe der entwickelten Spannung zu erwarten.

Mc Namara et al (70) fanden bei ihren Versuchen über die Wirkung von DFP auf den denervierten Katzengastrocnemius in situ bei direkter tetanischer Reizung ein gänzliches Aufhören der mechanischen Antwort innerhalb von 3 Std. nach Injektion von 10 mg DFP/kg Körpergewicht in die A. femoralis.

Methoden

20 g schwere weibliche NRMI - Mäuse wurden durch intra-peritoneale Injektion von Nembutal (100 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Das Operationsgebiet wurde mit Merfen-Tinktur sorgfältig gereinigt. Mit einem elektrischen Thermokauter wurde 4 mm lateral des os pubis ein kleiner Hautschnitt gelegt. Der Kauter wurde von hier aus in abgekühltem Zustand bis zum foramen obturatum in die Tiefe geführt und durch kurzes Einschalten des Stromes der N. obturatorius durchtrennt. Die Wunde wurde verschlossen, indem das Fell um die Wundränder mit Arasol bestrichen wurde und die Wunde so verklebte. 3% der Tiere starben an dem Eingriff. Frühestens nach 12 und spätestens nach 30 Tagen wurden die operierten Tiere durch einen Genickschlag getötet und der M. gracilis ant. auf der denervierten Seite unter ständigem Zutropfen einer Krebs-Henseleit-Lösung entnommen. Die denervierten Muskeln waren deutlich atrophisch. Mikroskopisch konnte man eine spindelförmige Degeneration der Muskelfaser erkennen. Zur weiteren Überprüfung der Wirksamkeit der Denervationsmethode wurden alle nicht mit DFP oder Bw 284 c 51 behandelten Muskeln einer Endplattenfärbung der AChE nach Kölle und Friedenwald (54) unterzogen.

Am 12. Tag nach der Denervation zeigte sich eine völlige Auflösung der Endplattenstruktur. Es bestand nur noch eine schwach diffuse Anfärbung des Endplattengebietes. Diese Befunde stehen im Einklang mit denen von Waser und Hadorn (106) am Zwerchfell der Maus durchgeführten Untersuchungen. Die Entnahme des denervierten Muskels geschah in der gleichen Art, wie es schon in der Versuchsreihe II beschrieben worden war. Der Muskel wurde jedoch nicht faserreduziert und sofort nach der Präparation vertikal am isometrischen Spannungsmeßgerät aufgehängt und in normale Krebs-Henseleit-Lösung eingetaucht. Reizung und Registrierung der Spannung erfolgte in gleicher Weise wie auf den Seiten 24, 25, 26 beschrieben. Die Empfindlichkeit des Torsionsbandes war der Spannungsentwicklung des denervierten Muskels angepaßt. Die Badelösung wurde ständig mit Carbogen durchströmt, gleichzeitig wurde frische Lösung mit einer Geschwindigkeit von 5 ml/Min. zugeführt. Der Muskel wurde zunächst 1 Stunde in normaler Krebs-Henseleit-Lösung gebadet, und die auf maximalen tetanischen Reiz entwickelte isometrische Maximalspannung im Abstand von 15 Min. registriert. Nach 60 Min. wurde das Bad völlig entleert und mit einer Krebs-Henseleit-Lösung, die einen AChE - Hemmer enthielt, wieder aufgefüllt. Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen lagen für DFP

zwischen 10^{-7} und 10^{-3} M, für Bw 284 c 51 bei 10^{-4} M. Zur Beobachtung einer möglichen raschen Wirkung von DFP wurden die Muskeln zunächst alle 5 Min. für die Dauer von 2 Std. gereizt. Für die Untersuchung der Wirkung von DFP bei langdauernder Inkubation erfolgte diätetanische Reizung alle 30 - 60 Minuten.

Nach Schrader (99) beträgt der Dampfdruck bei DFP bei 40°C 1,1 mm Hg und die Spontanhydrolyse erfolgt in wässriger Lösung bei Zimmertemperatur in 72 Std. zu 100 % .

Um die InhibitorKonzentration möglichst konstant und die Gasdurchströmung der Badelösung möglichst klein zu halten, wurde in einer 2. Versuchsserie zunächst 1 Std. lang in Krebs-Henseleit-Lösung die Höhe der tetanischen Kraft in 15-minütigem Abstand gemessen. Anschließend wurde die Temperatur der Badelösung bis auf 0°C abgekühlt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde das Badegefäß völlig entleert und mit Krebs-Henseleit-Lösung, die 10^{-3} oder 10^{-5}M DFP enthielt, und die ebenfalls auf eine Temperatur von 0°C eingestellt worden war, wieder aufgefüllt. Die Durchströmung mit Carbogen konnte dabei stark gedrosselt werden. Nach 3 Stunden wurde wieder auf 37°C erwärmt. Dies nahm 15 Min. in Anspruch. Nach weiteren 15 Min. wurde dann wiederum fortlaufend in 15-minütigem Abstand die auf

tetanischen Reiz hin entwickelte isometrische Spannung gemessen.

Walsh und Deal (105) konnten an der Nervenfasern des Frosches zeigen, daß nach Vorbehandlung mit CTMB (Cetyltrimethylammoniumbromid) in einer Konzentration von 0,4 mg/ml sich durch ACh ein reversibler Block der Erregungsleitung entwickelte. Wir vermuteten deshalb, daß CTMB auch DFP und Bw 284 c 51 das Eindringen und Durchdringen der Membran erleichtern könnte und dadurch eine Hemmer-Konzentration im myoplasmatischen Raum erzielt werden könnte, die intracelluläre Wirkungen erst ermöglichen würde.

Die von Walsh und Deal beschriebene CTMB - Konzentration konnte bei 37°C wegen der dabei auftretenden Schaumbildung nicht angewendet werden. Nachdem die maximale isometrische Muskelspannung auf tetanischen Reiz wie schon beschrieben in Normallösung festgestellt worden war, wurde wiederum auf 0°C abgekühlt und im Badegefäß eine CTMB - Konzentration von 10^{-3} oder 10^{-4} M eingestellt. Danach wurde das Badegefäß entleert und mit einer Lösung, die 10^{-5} M DFP bzw. 10^{-3} M Bw 284 c 51 enthielt, wieder aufgefüllt. Die Muskeln wurden in diesem Bad 4 Std. belassen.

30 Min. nach Wiedererwärmung auf 37°C wurde wiederum fortlaufend die auf tetanische Reizung hin entwickelte

isometrische Spannung gemessen.

Zur Prüfung der Wirksamkeit der verwendeten DFP - Lösung wurden 5 Muskeln, die 1 Stunde in $10^{-5}M$ DFP - Lösung gebadet worden waren, einer ACh-Färbung nach Couteaux und Taxi (18) unterzogen.

Ergebnisse

1. Abb. 6 zeigt, wie die tetanische isometrische Maximalspannung eines denervierten Warmblütermuskels zeitabhängig nachläßt. Die Spannungsabnahme während der ersten vier Versuchsstunden betrug durchschnittlich 10 %, nach acht Stunden 37 % der Ausgangsspannung.

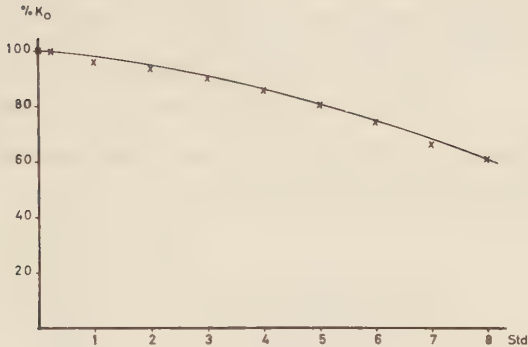


Abb.6 Isometrische Maxi.alspannung bei $L=1,25L_0$ und 37°C eines denervierten *M.gracilis* ant. der Maus in normaler Krebs-Henseleit-Lösung.

Reizbedingungen: Tetanische Reizung $150\text{ }\mu\text{/sec}$, Dauer eines μ -Reizes: 1 msec. Dauer der tetanischen Reizung: 1 sec.

Abszisse: Zeit [Std]

Ordinate: Tetanische isometrische Maxima bezogen auf das bei Versuchsbeginn gemessene Maximum.

2. Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, ist die AChE-Aktivität des Muskelhomogenats bei einer Konzentration von 10^{-6} M DFP vollständig gehemmt. Einwirkung dieser Hemmkonzentration auf einen denervierten *M.gracilis* in vitro zeigt nach 80 Min. keinen deutlichen Spannungsverlust. (Abb. 7)

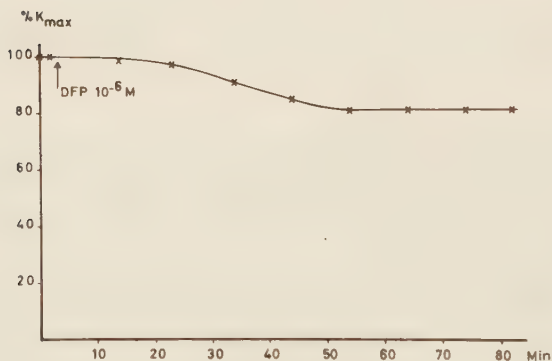


Abb. 7 Isometrische Maximalspannung bei $L=1,25L_0$ und 37°C eines denervierten *M.gracilis* ant. der Maus in Gegenwart von 10^{-6} M DFP.

Reizbedingungen wie Abb. 6

Abszisse: Zeit [Min.]

Ordinate: Tetanische isometrische Maxima bezogen auf das bei Versuchsbeginn gemessene Maximum.

3. Auch dreistündige Präinkubation in $10^{-5}M$ DFP bei $0^{\circ}C$ bewirkt keinen Spannungsabfall, eher eine leichte Spannungszunahme. (Abb. 8)

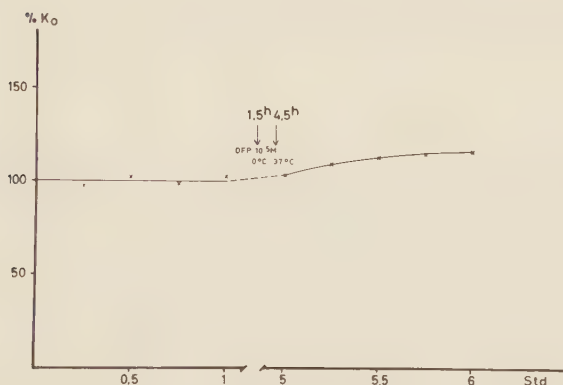


Abb. 8 Isometrische Maximalspannung bei $L=1,25L_0$ und $37^{\circ}C$ eines denervierten *M. gracilis* ant. der Maus nach dreistündiger Präinkubation bei $0^{\circ}C$ in $DFP 10^{-5}M$.

Reizbedingungen wie Abb. 6

Ordinate: Tetanische isometrische Maxima bezogen auf das bei Versuchsbeginn gemessene Maximum.

Abszisse: Zeit [Std.]

4. Ein Muskel wurde drei Stunden in $10^{-3}M$ DFP bei $0^{\circ}C$ inkubiert. Anschließend wurde in Gegenwart derselben AChE - Inhibitorkonzentration auf $37^{\circ}C$ aufgewärmt und die tetanischen isometrischen Maxima bestimmt. Dieser Muskel zeigte nach 7 Stunden noch über 50 % seiner Ausgangsspannung.

5. Die von Walsh und Deal (105) für den Froschnerven verwendete CTMB - Konzentration von $10^{-3}M$ bewirkte nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei $37^{\circ}C$ einen völligen Verlust der mechanischen Antwort auf tetanischen Reiz. Nach zweistündiger Inkubation derselben CTMB - Konzentration bei $0^{\circ}C$ zeigte sich ein starker, progressiver, auch durch Zugabe von frischer Krebs-Henseleit-Lösung nicht aufzuhaltender Spannungsverlust. (Abb. 9)

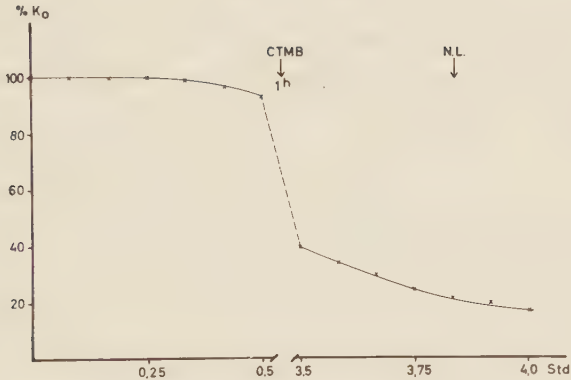


Abb. 9 Isometrische Maximalspannung bei $L=1,25L_0$ und 37°C eines denervierten *M. gracilis* ant. der Maus nach zweistündiger Behandlung mit 10^{-3}M CTMB bei 0°C .

Reizbedingungen wie Abb. 6

Reizabstand: 5 Minuten

NL↓ : Zugabe von frischer Krebs-Henseleit-Lösung ohne Zusätze.

Ordinate: Tetanische isometrische Maxima bezogen auf das bei Versuchsbeginn gemessene Maximum.

Abszisse: Zeit [Std.]

6. Bei einstündiger Vorbehandlung des denervierten Muskels mit 10^{-4} M CTMB bei 37°C und anschließen- der dreistündiger Inkubation mit 10^{-5} M DFP bei 0°C , konnte eine weitgehende, jedoch nicht vollständige Unterdrückung der mechanischen Antwort auf tetanischen Reiz erzielt werden. (Abb. 10)

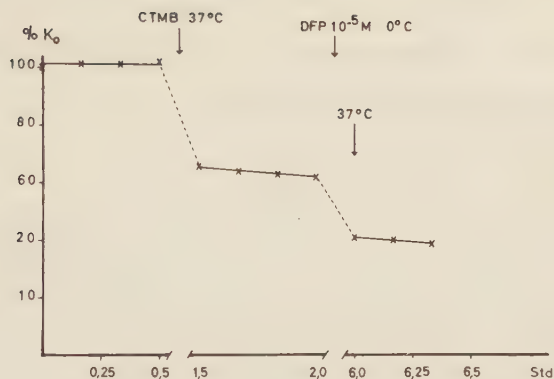


Abb. 10 Isometrische Maximalspannung bei $L=1,25 L_0$ und 37°C eines denervierten *M. gracilis* ant. der Maus nach einstündiger Vorbehandlung mit 10^{-4}M CTMB bei 37°C . Anschließend Auswaschen mit normaler Krebs-Henseleit-Lösung und Messung der isometrischen Maximalspannung. Danach dreistündige Inkubation in 10^{-5}M DFP bei 0°C . Reizbedingungen wie Abb. 6

Reizabstand: 10 Min.

Ordinate: Tetanische isometrische Maxima bezogen auf das bei Versuchsbeginn gemessene Maximum.

Abszisse: Zeit [Std.]

7. Durch 10^{-4} M Bw 284 c 51 konnte auch bei einstündiger Vorbehandlung mit 10^{-4} M CTMB bei 37°C keine Abnahme der mechanischen Antwort auf tetanischen Reiz hin nachgewiesen werden.
8. Nach einstündiger Inkubation von Faserbündeln des *M. gracilis* ant. in 10^{-5} M DFP waren die von Ulbrecht und Kruckenberg (101) beschriebenen Körnchen, sowie die degenerierten Endplattenzonen nach Färbung nach Couteaux und Taxi (18) lichtmikroskopisch nicht mehr nachweisbar.

Diskussion der Ergebnisse

In der Versuchsreihe A wurde durch maximale Beladung der sarkoplasmatischen Vesikeln mit $0,1 - 0,15 \mu$ Mole Ca^{++} / mg N ein möglichst hohes Ca^{++} - Konzentrationsgefälle zwischen intra- und extravesikulären Raum erzielt. Dieses Gefälle ist erforderlich, wenn durch ACh induzierte Permeabilitätsänderungen der Vesikelmembran experimentell erfaßbar gemacht werden sollen. Es wird nämlich solange ein Ca^{++} - Nettostrom aus den Vesikeln in den extravesikulären Raum aufrecht erhalten, bis eine Ca^{++} - Gleichverteilung erreicht ist.

Die Kontraktion des in ATP - Lösung aufgehängten Fasermodells des Skelettmuskels dient als Indikator für das aus den Vesikeln entlassene Ca^{++} . Mit einer $[\text{Ca}^{++}] \approx 10^{-6} \text{M}$ wird die kontraktile Myosin-ATPase aktiviert.

Die Versuchsergebnisse von Nagai (80) waren nicht schlüssig, weil er kein ausreichendes $[\text{Ca}^{++}]$ - Gefälle von intra- nach extravesikulär hergestellt hatte.

Die jetzt vorgelegten negativen Ergebnisse zeigen, daß ACh die Ca^{++} - Permeabilität der Vesikelmembran nicht erhöht. Es muß allerdings eingeräumt werden, daß die

Prozedur der Vesikelpräparation die Membranreagibilität mit ACh beeinträchtigen könnte.

Dies ist aus zweierlei Gründen denkbar:

1. Weil es experimentell unmöglich ist, den myoplasmatischen Raum *in vitro* zu simulieren.
2. Weil die isolierten Vesikeln durch die Präparationsmethode " umgestülpt " worden sein könnten. Dann würde die normalerweise intravesikulär gerichtete Membranseite extravesikulär liegen. Wenn die ACh - Rezeptoren *in situ* an der dem Myoplasma zugewendeten Membranoberfläche liegen, können sie nach der "Umstülpung" nicht mehr von ACh erreicht werden. Wenn auch dies nicht sehr wahrscheinlich ist, kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, solange nicht zwingende experimentelle Befunde vorliegen.

Sandow, Taylor und Preisser (95) schlagen vor, daß die Erregung der äußeren Muskelmembran über den T - Apparat in die Tiefe geleitet wird und dort Calcium aus den terminalen Zisternen und dem longitudinalen Apparat freisetzt.

Hodgkin und Horowicz (45) fanden Hinweise, daß der Kaliumpermeabilität bei der Erregung des Skelettmuskels

im Bereich des transversalen Apparates eine besondere Bedeutung zukommt. Freygang (32) diskutiert eine elektrophysiologische Erregungsleitung in die Tiefe der Muskelfaser und eine selektive Permeabilität der Membranen des SPR für Kaliumionen. Jedoch reicht der Kaliumeinstrom in die terminalen Zisternen nicht aus, um Ca^{++} im Sinne eines Ionenaustausches in der zur Aktivierung notwendigen Konzentration von $\sim 10^{-4}$ M freizusetzen.

Freygang vermutete deshalb die Anwesenheit eines Verstärkermechanismus. Dieser Verstärkermechanismus könnte darin bestehen, daß ein aktionspotentialähnlicher Vorgang mit gleichzeitiger Erhöhung der Ca^{++} - Permeabilität an den Membranen der terminalen Zisternen und des longitudinalen Apparates abläuft. Lee und Mitarbeiter (62) glaubten zeigen zu können, daß glycerinextrahierte Muskelfasern bei bestimmten Reizbedingungen kontrahieren. Außerdem soll Ca^{45} aus SPR - Präparationen unter ähnlichen Reizbedingungen freigesetzt werden.

In eigenen Versuchen konnte dies jedoch nicht bei Anwendung der von Lee angegebenen Reizspannung reproduziert werden.

Bei einem Elektrodenabstand von 10 mm kam es erst bei Spannungen von 90 V zu einer Spannungsentwicklung der glycerinextrahierten Einzelfaser, wobei jedoch eine

Eiweißkoagulation in der Nähe beider Elektroden beobachtet wurde. Berechnet man den mittleren Potentialgradienten für ein SPR - Fragment (mittlerer Durchmesser ca. $0,2\mu\text{m}$), so ergibt sich bei den von Lee und Mitarbeitern gewählten Reizbedingungen ein Potentialgradient von weniger als $70\mu\text{V}$ pro Einzelfragment. Eine elektrotonische Veränderung eines möglicherweise vorhandenen Membranpotentials erscheint deshalb durchaus fraglich.

Costantin und Podolski (17) erhielten bei Versuchen mit vom Sarkolemm befreiten Muskelfasern des M. semitendinosus des Frosches ebenfalls Hinweise für einen elektrischen Triggermechanismus der Calciumfreisetzung. Bei Reizung in Längsrichtung der Muskelfaser kam es im "entnähuteten" Bereich der Muskelfaser zur Kontraktion einzelner Sarkomeren. Gleichen Effekt hatte die Applikation von Mikrotröpfchen mit 140 mM KCl oder Trischlorid. Costantin und Podolski diskutieren die Möglichkeit einer selektiven Permeabilität des T- Apparates für Kationen und einer selektiven Permeabilität des longitudinalen Apparates und der terminalen Zisternen für Anionen, insbesondere für Cl^- .

Nach den Befunden von Ulbrecht und Kruckenberg wäre es weiterhin denkbar, daß der von Freygang geforderte Ver-

stärkermechanismus mit einer Freisetzung von ACh oder ihm ähnlichen Stoffen an der Kontaktstelle von transversalem Apparat und terminaler Zisterne angestoßen wird. Die engen strukturellen Beziehungen zwischen transversalem Apparat und terminaler Zisterne lassen vermuten, daß die Permeabilität der terminalen Zisterne für Ca^{++} von der Intaktheit beider Strukturen abhängig ist. Nach Hasselbach (pers. Mitteilung) kommt es bei isolierten sarkoplasmatischen Vesikeln erst bei unphysiologisch hoher extravesikulären Chloridkonzentrationen von 600 mM zum Calciumefflux. Costantin und Podolsky verwendeten jedoch nur Konzentrationen von 70 - 140 mM.

Möglicherweise beruht also die Wirkungslosigkeit von AChCl auf die Calciumpermeabilität einfach darauf, daß die strukturelle Basis der funktionellen Beziehung während der Präparation des SPR zerstört wurde. Diese Vermutung wird durch die Befunde der Versuchsreihe B bestärkt, bei denen durch AChCl an kaliumdepolarisierten Skelettmuskelbündeln reversible Kontraktionen zu beobachten waren.

Nach den Befunden von Axelson und Thesleff (3), von Frank (30) sowie von Lüttgau und Mitarbeitern (68)

ist Coffein in der Lage, an einem kaliumdepolarisierten Skelettmuskelbündel langdauernde Kontraktionen zu erzeugen. Die Kontrakturspannung ist ungefähr die gleiche, wie bei einer Kaliumkontraktur.

Die Coffein-Kontraktur tritt auch dann ein, wenn durch Calciumentzug die Membran unerregbar wurde, bzw. der Ca^{++} -bedürftige Kopplungsmechanismus ausgeschaltet wurde und aus diesen Gründen keine Kaliumkontraktur mehr möglich ist.

Caldwell (8) konnte durch intracelluläre Injektion von Coffein in die Krabbenmuskelfaser Kontraktionen erzielen. Diese Kontraktionen waren sowohl bei polarisierter, als auch depolarisierter Membran nachweisbar. Daraus kann geschlossen werden, daß der Angriffspunkt der Coffeinwirkung der Depolarisation der Muskelmembran und des transversalen tubulären Systems - sei es durch Aktionspotentiale, sei es durch hohe Kalium-Außenkonzentrationen - funktionell nachgeschaltet ist. Mit Hilfe von extrahierten Fasernmodellen konnte Nagai (80) zeigen, daß der Erschlaffungsfaktor durch Coffein blockiert wird.

Dagegen fanden Carsten und Mommaerts (9), daß die Calciumpumpe des SPR bei einer Coffeinkonzentration von 5 mM nur um 10% gehemmt wird. Obwohl beide Autorengruppen die gleichen Präparationsmethoden anwandten,

widersprechen sich ihre Ergebnisse. Fraglich bleibt, ob durch Präparationsmethoden bestimmte Funktionen ausgelöscht werden, die an eine intakte Mikroarchitektur der Zelle gebunden sind.

Die Tatsache, daß sich mit hohen Dosen von ACh am kaliumdepolarisierten Skelettmuskelbündel in Abwesenheit von Calciumionen keine der Coffeinkontraktur ähnliche Spannungsentwicklung auftritt, läßt auf einen anderen Mechanismus der Auslösung der Ca^{++} - abhängigen Kontrakturen schließen.

Eine direkte Wirkung von ACh auf die Membran der terminalen Zisternen und des longitudinalen Apparates ist nach den vorliegenden Befunden auszuschließen. Es muß vielmehr wegen der Ca^{++} - Abhängigkeit der Kontrakturen vermutet werden, daß die Kontrakturen durch eine noch unbekannte Zustandsänderung des Sarkolemm oder der Membran des transversalen Apparates hervorgerufen werden. Solche Veränderungen der Membran werden sogar bei Einstichen zur intracellulären Potentialableitung mit Glasmikroelektroden beobachtet. Eine in Ca^{++} - freiem Bad befindliche Membran setzt der eindringenden Elektrode einen erheblich höheren Widerstand entgegen. Die Membran erscheint "spröde". Ist der Einstich gelungen, bleiben Kurzschlußströme bestehen. Bei Ca^{++} - haltigen Membranen

verschwinden sie wegen des "healing over" innerhalb von Sekunden.

Aus den Arbeiten von Frank (30), Lüttgau (65,66) sowie von Edman und Grieve (23) geht hervor, daß den Ca^{++} im Außenmilieu eine entscheidende Rolle bei der elektromechanischen Kopplung zugemessen werden muß. Ein extracellulärer Ca^{++} -Entzug und die damit verbundene Calciumabgabe aus dem Sarkolemm scheint die $[\text{Ca}^{++}]$ in den als intracellulären Calciumspeicher anzusehenden terminalen Zisternen nicht oder nur wenig zu beeinflussen. Dies ist die logische Konsequenz aus den bereits erwähnten Versuchen von Frank und Caldwell.

Nach Koketsu (58) wird Calcium an negativ geladenen Positionen von Lipoproteinen der cytoplasmatischen Membran gebunden. Milligan und Edwards (73) konnten zeigen, daß eine Skelettmuskelfaser in der Lage ist, nach Calciumverarmung der Membran und anschließender Kaliumdepolarisation ihr Membranruhepotential in normaler Ringerlösung rasch wiederherzustellen. Dagegen beansprucht die Fähigkeit, auf eine erneute K^{+} -bedingte Depolarisation mit maximaler Spannungsentwicklung zu antworten mehr Zeit, als zur Wiederherstellung des Membranruhepotentials. Die Autoren schlossen daraus auf

einen langsamen Bindungsvorgang von Calcium an die Muskelmembran an solchen Orten, die zur Kontraktionsauslösung Ca^{++} -Sättigung benötigen.

Die Untersuchungen der Versuchsreihe B lassen einen solchen langsamen Bindungsvorgang für Calcium ebenfalls vermuten.

Die Versuchsreihe B führt zu dem Ergebnis, daß der kaliumdepolarisierte Skelettmuskel nur dann durch AChCl zur Kontraktur veranlaßt wird, wenn ausreichend Ca^{++} an die Membran gebunden sind. Wird der Ca^{++} -verarmten Membran AChCl angeboten, erfolgt keine mechanische Antwort. Erst wenn Ca^{++} zugegeben werden, entwickelt sich nach einer Latenzzeit von im Mittel 52 Sek. eine langsam zunehmende Spannung. Wenn dagegen vor der AChCl-Zugabe zur depolarisierten Ca-verarmten Membran Ca^{++} angeboten werden, steigt die Spannung rasch nach einer Latenz von nur 2-3 Sek.

Zur Erklärung dieses Phänomens bieten sich analoge Vorstellungen an, wie sie von Katz (55) für die quantenhafte ACh-Freisetzung an der neuromuskulären Synapse entwickelt wurden. Die Bindung der Membran eines synaptischen Vesikels an die Innenseite der präsynaptischen Membran ist von der Anwesenheit von Ca^{++} im Extra-

cellulärraum, d.h. im synaptischen Spalt, abhängig. Im Sinne dieser Vorstellung wäre anzunehmen, daß Ca^{++} im Lumen des mit dem Extracellulärraum kommunizierenden T-Apparates notwendig sind, um zwischen den beiden Membranen eine Reaktion zu ermöglichen. Hierbei wäre die terminale Zisterne das Analogon zum synaptischen Vesikel. Die Reaktion der beiden Membranen miteinander würde zur Eröffnung der terminalen Zisterne zum Lumen des T-Apparates in ähnlicher Weise führen, wie das von Katz vermutete Öffnen des synaptischen Vesikels. Dann würde der reagierende Vesikel in die präsynaptische Membran für wahrscheinlich kurze Zeit einbezogen werden und seinen Inhalt in den synaptischen Spalt abgeben. Bei einer ähnlichen Reaktion zwischen den Membranen von terminalen Zisternen und T-Apparat würde es zu einem Einstrom der im Extracellulärraum befindlichen Ionen in den Intravesikulärraum kommen. Damit gelangt auch ACh, das dem Versuchsbad in hoher Konzentration beigelegt wurde, in die terminalen Zisternen. Die Zisternenmembran wird dadurch Ca^{++} - durchlässig und die Kontraktion beginnt.

Die unterschiedliche mechanische Latenzzeit könnte dann verstanden werden, wenn man annimmt, daß die Reaktion der Ca^{++} mit der calciumverarmten Membran die geschwin-

digkeitsbegrenzende Reaktion darstellte. Eine ausreichende Ca-Sättigung der Membran aber wäre nach dem Gesagten Voraussetzung für die Reagibilität der tubulären mit der zisternalen Membran. Dieses Denkmodell erklärt auch, weshalb die Geschwindigkeit der Spannungszunahme dann geringer ist, wenn dem kaliumdepolarisierten Ca-verarmten Muskelpräparat erst ACh und dann Ca^{++} angeboten wird.

Werden die beiden Stoffe in umgekehrter Reihenfolge - erst Ca^{++} und dann ACh wirksam - würde der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt der Ca-Sättigung der Membran im Experiment nicht erkennbar. Denn ACh wird erst zugegeben, nachdem die Membran 3 Min. lang mit den Ca^{++} reagieren und sich mit Ca sättigen konnte.

Dieses Denkmodell fordert, daß die Geschwindigkeit der Spannungsentwicklung durch die Diffusion des ACh von der Faseroberfläche durch die transversalen Tubuli bestimmt wird. Jeweils ein "Zylindermantel" von Fibrillen innerhalb einer Faser ist gleichzeitig durch das ACh aktiviert: Einerseits können die innerhalb dieses Zylindermantels liegenden Fibrillen an der Faserkontraktion noch nicht teilnehmen, weil ACh noch nicht dorthin gelangt ist, andererseits werden ACh-Rezeptoren durch

ihren spezifischen Erregungsstoff desensibilisiert. Deshalb kann nicht erwartet werden, daß die Zisternenmembran so lange ihre hohe Ca-Permeabilität beibehält, wie ACh zugegen ist. Auch in ACh-Gegenwart ist der anfängliche ACh-Effekt rückläufig. Dieser Desensibilisierungseffekt wurde von Thesleff 1960 beschrieben. Die ACh-Rezeptoren werden erst dann wieder ACh-empfindlich, wenn es nach Entfernung erneut angeboten wird.

Die Diffusionsverhältnisse und die besondere Eigenschaft der Desensibilisierung lassen erwarten, daß die Spannungsentwicklung einer depolarisierten Muskelfaser, der in Gegenwart von Ca^{++} ACh zugefügt worden ist, nur einen Bruchteil der Tetanusspannung entwickeln kann. Dabei ist die anfängliche Spannung höher als die dann folgende, weil die Zahl der gleichzeitig aktivierten Fibrillen abnimmt. Das muß so sein, weil die ringförmige Querschnittsfläche des aktivierten Fibrillenmantels mit zunehmender Eindringtiefe des ACh in die Faser abnimmt. Diese theoretischen Überlegungen sind durch die Versuchsergebnisse bestätigt worden.

Bei der oben dargelegten Erklärung sind die Beobachtungen von Costantin und Podolsky (17) nicht mit einbezogen. Diese Autoren fanden, daß sarkolemmlose Muskel-

fibrillenbündel sich kontrahieren, wenn ihnen im Paraffinölmilieu Mikromengen von Cl^- -haltigen Lösungen angeboten werden. Die Kontraktionen erfolgten nur im Kontaktbereich des Tröpfchens mit den Fibrillen. In unseren Experimenten wird mit der ACh-Zugabe die $[\text{Cl}^-]$ im Extracellulärraum beträchtlich erhöht, weil ACh als Chlorid angeboten wird.

Der Quotient $\frac{[\text{Cl}^-]_a}{[\text{Cl}^-]_i}$ nimmt deshalb erheblich zu. Da das zugehörige Kation ACh schwer permeabel ist, und außerdem die Cl-Permeabilität nach Untersuchungen von Hodgkin und Horowicz (43) in beiden Richtungen mit $4 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$ nahe der K - Einwärts-Permeabilität von $8 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{sec}^{-1}$ liegt, muß ein Einfluß der Cl^- auf das Membranpotential erwartet werden. Dieser Einfluß ist jedoch, wie die Tabelle 2 zeigt, gering. Das Membranpotential wird bei Zugabe von NH_4Cl , Tris-Cl oder AChCl in den aus der Tabelle zu entnehmenden Konzentrationen um 3-6 mV negativer. Es muß natürlich berücksichtigt werden, daß dieser Betrag sich zusammensetzt aus veränderten Gleichgewichtspotentialen des Chlorids und der Kationen K^+ und Na^+ . Die Anteile können nicht aus den vorliegenden Meßdaten abgeleitet werden.

Der erheblich vergrößerte $[\text{Cl}^-]$ - Gradient läßt einen Net-

toeinstrom in den myoplasmatischen Raum erwarten. Dadurch nimmt die $[Cl^-]_i$ zu. Nach den Arbeiten von Constantin und Podolsky (17) aber können Cl^- Fibrillenkontraktion auslösen. Leider ist über die Cl -Permeabilität des Sarkolemm in Abhängigkeit von seiner Ca -Sättigung nichts bekannt. Nimmt man jedoch an, daß zwischen beiden Größen eine Abhängigkeit besteht, würde der Anstoß zur Kontraktion erst dann beginnen, nachdem die Membran durch Ca^{++} ausreichend Cl -permeabel gemacht worden ist und so die myoplasmatische $[Cl^-]$ erhöht wurde.

Für die Form der Spannungsentwicklung und der mechanischen Latenzzeit gilt das gleiche wie es oben für die ACh-Hypothese dargelegt wurde. Die vorliegenden Versuche lassen zunächst noch beide Deutungen zu. Eine weitere Klärung könnte durch Fluxmessungen für Cl in Abhängigkeit von der Ca -Beladung der Membran erwartet werden.

Von Nachmansohn (76,77,78,79) wurde immer wieder die Vermutung ausgesprochen, daß das ACh-System einen funktionellen Einfluß auf die konduktile Membran besäße. Bei sehr hohen $[ACh]$ mußte deshalb erwartet werden, daß die Permeabilität des Sarkolemm für Kationen zunimmt.

Dann würden auch Ca^{++} aus dem Extracellulärraum in das Innere der Faser diffundieren und so den kontraktilem Apparat aktivieren. Mit zunehmender Zeit dringen die Ca^{++} immer tiefer in die Fasern ein und aktivieren deshalb immer mehr Fibrillen. Dann wäre zu erwarten, daß die Spannung zeitproportional bis zum Erreichen der tetanischen Maximalspannung zunimmt. Dies aber ist in keinem Versuch der Fall. Vielmehr führt die hohe extracelluläre $[\text{Ca}^{++}]$ und $[\text{ACh}]$ nur zu einer Spannung, die höchstens 26 % der tetanischen Maximalspannung entspricht.

Es bleiben infolgedessen nur zwei Erklärungsmöglichkeiten über. Das ACh stellt im "synaptischen Bereich" zwischen T-Apparat und terminalen Zisternen ein Funktionsglied in der Koppelung von Erregung und Kontraktion dar. Die Alternative ist, daß die myoplasmatischen $[\text{Cl}^-]$ für die Freisetzung der Ca^{++} aus den terminalen Zisternen verantwortlich ist. Dazu müßte die Cl - Permeabilität der Membran des T-Apparates von ihrer Ca^{++} -Sättigung abhängen.

Ebenfalls muß bei der Beurteilung der AChCl-Wirkung auf kaliumdepolarisiertes Skelettmuskelbündel eine Wirkung durch die nach AChCl vergrößerte Osmolarität der Außen-

lösung ausgeschlossen oder unwahrscheinlich gemacht werden.

Die angestellten Kontrollversuche, in denen mit KCl die gleiche Osmolarität wie im ACh-Bad hergestellt wurde, verursachte keine Spannungszunahme. Nach Dydynska und Wilkie (20) tritt eine Schädigung des Skelettmuskels, der in hypertoner Lösung eine auffallende Vergrößerung des Lumens des transversalen Apparates zeigt, erst bei einer Überschreitung der Osmolarität um das 4-fache auf.

Trotzdem bleibt die Möglichkeit offen, daß die beobachteten Kontrakturen durch osmotisch bedingte Veränderungen der funktionellen Struktur der terminalen Zisternen hervorgerufen wurden, die morphologisch noch nicht erkennbar sind.

Mc Namara et al (70) haben am direkt gereizten, denervierten M. gastrocnemius der Katze einen erheblichen Einfluß von AChE-Blockern (DFP) auf die mechanische Antwort gezeigt. Es handelt sich dabei um Versuche am lebenden Tier. Sie lassen die Vermutung zu, daß DFP Einfluß auf die Erregbarkeit oder auf die elektromechanische Koppelung hat. In eigenen Versuchen wurde jedoch gezeigt, daß DFP keinerlei Wirkung auf die Ca-Permeabilität der präparierten terminalen Zisternen hat, wie dies auf

Seite 20 dargelegt wurde. Um den Angriffspunkt der ChE-Hemmer zu fixieren, wurden in der Versuchsreihe C chronisch denervierte Skelettmuskeln nach Präinkubation in DFP oder Bw 284 c 51 in vitro tetanisch gereizt. Die Abb. 7 und 8 zeigen, daß die AChE-Blocker die mechanische Antwort auf direkte Reizung nicht beeinträchtigen. Die von Mc Namara erhobenen Befunde können unter in vitro Bedingungen nicht reproduziert werden. Dies kann nicht auf mangelhafte Wasserlöslichkeit von DFP oder Bw 284 c 51 bezogen werden. Die von den Autoren benutzte Injektionsdosis von 10 mg/kg Körpergewicht führt im Gesamtorganismus zu einer Konzentration, die nicht größer ist als der maximalen Wasserlöslichkeit von DFP entspricht. Bw 284 c 51 ist sogar gut wasserlöslich. Sein hohes Molekulargewicht von 560 erschwert allerdings das Eindringen bzw. die Permeation der Membranen. Es ist denkbar, daß die von Mc Namara et al. erhobenen Befunde weniger auf der Hemmung der AChE als vielmehr auf der Blockade von ACh-Rezeptoren im Bereich des sarkoplasmatischen Retikulum oder auf ganz anderen noch unbekannten Prinzipien beruhen. Da ACh sowohl mit der Esterase als auch mit dem Rezeptor reagieren kann, sollte erwartet werden, daß ein Molekül wie z.B. DFP, das zur Esterase eine hohe chemische Affinität hat, auch mit dem cholinergen Rezeptor reagieren kann. Wenn dieser durch

DFP blockiert ist, er aber im Koppelungsmechanismus eine Rolle spielte, müßte DFP-Applikation zu einer Kontraktionshemmung führen. Dies aber konnte durch die in vitro Versuche mit definierten Reizbedingungen und Hemmstoffkonzentrationen nicht beobachtet werden. Selbst dreistündige Inkubation in 10^{-3} M DFP hebt die direkte Erregbarkeit und die mechanische Antwort hierauf nicht auf.

Es ist deshalb vernünftig anzunehmen, daß die AChE-Hemmer keinen Einfluß auf solche Prozesse besitzen, die eine ACh-Kontraktur hervorrufen an Skelettmuskelbündeln, deren Sarkolemm mit KCl auf -15 mV depolarisiert wurde.

Endres (26) fand bei Untersuchungen mit radioaktiv markiertem DFP am isolierten SPR eine AChE - Rasterdichte und eine Wechselzahl, die größenordnungsmäßig der der Erythrozyten-Membran entspricht. Sie unterschied sich damit deutlich von gleichen Größen cholinergischer synaptischer Strukturen. Bei überschlagsmäßiger Berechnung der Rasterdichte der AChE im Kontaktbereich zwischen transversalem Apparat und terminaler Zisterne zeigte sich, daß nur ungefähr 0,2% der Kontaktfläche mit AChE besetzt sind. Es liegt deshalb der Schluß nahe, daß die Anwesenheit der AChE im

SPR unspezifisch ist und daß das ACh - AChE - System bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion im Skelettmuskel nicht beteiligt ist. Diese Erklärung wird ferner durch die geringe Aktivierungsenergie gestützt, die für die enzymatische Spaltung des ACh durch die membrangebundene AChE des SPR nötig ist (Ulbrecht 1967, Habilitationsschrift).

Trotz der negativen Befunde für die funktionelle Bedeutung der membrangebundenen AChE des SPR bleibt die sofortige Auslösung einer ACh-Kontraktur einer erschlafften kaliumdepolarisierten Faser ebenso eine offene Frage, wie die verzögerte, langsam sich entwickelnde ACh-Kontraktur, wenn der erschlafften kaliumdepolarisierten Faser CaCl_2 angeboten wird. Durch die Messungen der Membranpotentiale unter den genannten Bedingungen können elektrische Ursachen für die Kontrakturen mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung

1. Es wurde der Einfluß des ACh auf die elektromechanische Kopplung am intakten Skelettmuskel und unter Verwendung von Fasermodellen des Skelettmuskels untersucht, nachdem AChE im sarkoplasmatischen Retikulum (SPR) durch fermentkinetische Messungen identifiziert worden war.
2. Bis zu 130 mMol/l ACh und 17,5 mMol/l Succinyl-bis-Cholin können weder bei aktivierter AChE des SPR noch bei vollständig durch 10^{-5} Mol/l DFP oder durch 10^{-4} Mol/l Bw 284 c 51 gehemmter AChE experimentell gespeichertes Calcium aus präparativ gewonnenem SPR wieder freisetzen. Hierbei diente die ATP Kontraktion glycerin-extrahierter Einzelfasern des Kaninchenpsoas als Indikator für Ca^{++} . Die Ca^{++} - Akkumulation des SPR reichte bis 0,15 $\mu\text{Mol Ca}^{++}/\text{mg Stickstoff}$ des SPR. Bei homogener Verteilung im Kontraktionsbad würde damit eine $[\text{Ca}^{++}]$ von 0,1 mMol/l erzielt werden.
3. An intakten Bündeln von Skelettmuskeln (M. gracilis der Maus) führt 100 mMol/l ACh auch dann zur sofortigen Kontraktur, wenn die Fasern im Ca-Mangel mit

101 mMol/l K^+ auf -15 mV depolarisiert worden waren. Bedingung für die Kontraktur ist, daß $CaCl_2$ 3 Min. vorher zugesetzt wurde. Das Membranpotential verschob sich dadurch von -15 mV auf -21 mV.

Die mechanische Latenz beträgt 2-3 Sek., die Gipfelzeit 33 Sek.

4. Wird den in Ca-Mangel durch 101 mMol/l K^+ depolarisierten Faserbündeln 10 mMol/l $CaCl_2$ 3 Min. nach Inkubation in 100 mMol/l ACh angeboten, erfolgt die Kontraktur nach 52 Sek. Die Gipfelzeit beträgt 180 Sek.

Das Membranpotential der Ca-verarmten K^+ -depolarisierten Faser steigt durch die Zugabe der beiden Stoffe in der Reihenfolge ACh, $CaCl_2$ von -15 mV auf -17 mV. (Trotz 130 Messungen ist der Unterschied statistisch nicht signifikant).

5. Das Membranpotential wurde unter allen angewendeten Milieubedingungen durch Mehrfachmessungen mit Glas-mikroelektroden bestimmt. Dabei wurde der Einfluß von "liquid-junction-potentials" durch Differenzverstärkertechnik eliminiert. Die erhaltenen Werte sind tabelliert (S. 41).

6. Auch durch hohe Konzentration von spezifischen (Bw 284 c 51) und unspezifischen (DFP) AChE-Hemmern konnte weder an intakten noch an chronisch denervierten (> 12 Tage) Skelettmuskelfasern eine Veränderung der isometrischen Maximalspannung bei optimaler tetanischer Reizung festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu der hemmenden DFP-Wirkung auf die von Mc Namara et al untersuchte in vivo Kontraktion.

Literaturverzeichnis

1. Adams, N.L. and Bay, E.
The Pharmacologist, 5, 244, 1963
2. Adrian, R.H.
J. Physiol. 133, 631, 1956
3. Axelsson, J. and Thesleff, S.
Acta Physiol. Scand. 44, 55, 1958
4. Barstad, J.A.B.
Arch. internat. Pharmacodyn. 107, 21, 1956
5. Bianchi, C.P. and Shanes, A.M.
J. Gen. Physiol. 42, 803, 1959
6. Brown, L.M.
Bibl. anat. 2, 21-33, 1961
7. Caldwell, P.C. and Walster, G.
J. Physiol. 128, 12, 1955
8. Caldwell, P.C.
J. Physiol. 169, 353, 1963
9. Carsten, M.E. and Mommaerts, W.F.H.M.
J. Gen. Physiol. 48, 183, 1964
10. Carvalho, A.P. and Leo, B.
J. Gen. Physiol. 50, 1327, 1967
11. Carvalho, A.P.
J. Gen. Physiol. 51, 427, (1968)
12. Conway, E.J.
Biol. Rev. 20, 56, 1945
13. Conway, E.J.
Physiol. Rev. 37, 84, 1957
14. Costantin, I.L. and Podolsky, R.J.
Fed. Proc. 24, 1141, 1965

15. Costantin, L.L., Franzini-Armstrong, C.
and Podolsky, R.
Science, 147, 158, 1965
16. Costantin, L.L. and Podolsky, R.J.
J. Gen. Physiol. 50, 1101, 1967
17. Costantin, L.L.
J. Physiol. 195, 119, 1968
18. Couteaux, R. and Taxi, I.
Arch. Anat. Micro, Morph. Exp. 41, 352, 1952
19. Davies, R.E.
Nature, 199, 1068, 1963
20. Dydynska, M. and Wilkie, D.R.
J. Physiol. 169, 312, 1963
21. Ebashi, S. and Lipmann, F.
J. cell. Biol. 14, 389, 1962
22. Ebashi, S.
J. Biochem. (Tokyo) 50, 236, 1961
23. Edman, K.A.P. and Grieve, I.W.
J. Physiol. 170, 138, 1964
24. Ehrenpreis, S.
Nature, 201, 887, 1964
25. Endo, M.
Nature, 202, 1115, 1964
26. Endres, W.
Inaugural Dissertation, Physiol. Inst.
d. Univ. München, 1967
27. Fleckenstein, A., Hille, H., Adam, W.E.
Pflügers Archiv, 253, 264, 1951
28. Fleckenstein, A. und Richter, F.
Pflügers Archiv 257, 1, 1953

29. Fleckenstein, A.
Der Kalium-Natrium-Austausch als Energieprinzip in Muskel und Nerv.
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
1955
30. Frank, G.B.
J. Physiol. 151, 518, 1960
31. Frank, G.B.
J. Physiol. 165, 19 P, 1963
32. Freyng jr., W.H.
Fed. Proc. 24, 1135, 1965
33. Groblewski, G.E., Mc Namara, B.P. and Wills, J.H.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 118, 116, 1956
34. Hasselbach, W. and Makinose, M.
Biochem. Z. 333, 518, 1961
35. Hasselbach, W. and Makinose, M.
Biochem. Z. 339, 94, 1963
36. Hasselbach, W.
Fed. Proc. 23, 909, 1964
37. Hasselbach W.
pers. Mitteilung 1969
38. Heilbrunn, L.V. and Wiercinski, F.J.
J. Cell. Comp. Physiol. 29, 15, 1947
39. Hill, A.V.
Proc. Roy. Soc. B. 135, 446, 1948
40. Hill, A.V.
Proc. Roy. Soc. B. 136, 399, 1949
41. Hill, D.K.
J. Physiol. 175, 275, 1964

42. Hinterbuchner, L. und Nachmansohn, D.
Biochem. Biophys. Acta 44, 554, 1960
43. Hodgkin, A.L. and Horowicz, P.
J. Physiol. 148, 127, 1959
44. Hodgkin, A.L. and Horowicz, P.
J. Physiol. 153, 370, 1960
45. Hodgkin, A.L. and Horowicz, P.
J. Physiol. 153, 386, 1960
46. Hodgkin, A.L. and Horowicz, P.
J. Physiol. 153, 404, 1960
47. Holmstedt, B.
Acta phys. Scand. 40, 322, 1957
48. Huxley, A.F. and Taylor, R.E.
J. Physiol. 144, 426, 1958
49. Huxley, A.F.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 81, 446, 1959
50. Huxley, A.F.
Proc. of the Int. Union of Physiol. Sc. Vol IV
51. Huxley, H.E.
Nature, 202, 1067, 1964
52. Jenkinson, D.H. and Nicholls, J.G.
J. Physiol. 159, 111, 1961
53. Karnowsky, M.J.
J. of. cell. biol. 23, 217, 1964
54. Koelle, G.B.
Handbuch der experimentellen Pharmakologie Band XV
Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1963
55. Katz, B.
Proc. of the Int. Union of Physiol. Sc. Vol IV,
1965

56. Koketsu, K. and Miyamoto, S.
Nature, 189, 403, 1961
57. Koketsu, K., Kitamura, R. and Tanaka, R.
Amer. J. Physiol. 207, 509, 1964
58. Koketsu, K.
Proc. Intern. Union Physiol. Sciences
59. Krebs, H.A. und Henseleit, K.
Z. für physiol. Chemie 210, 33, 1932
60. Krebs, H.A.
Biochim. Biophys. Acta 4, 249, 1950
61. Krebs, H.A., Bennett, D.A.H., de Gasquet, P.,
Gascogne, T. and Yoshida, T.
Biochem. J. 8b, 22, 1963
62. Lee, K.S., Ladinsky, H., Choi, S.J. and Kasuya, Y.
J. Gen. Physiol. 49, 689, 1966
63. Lobsiger, E.A.
Inaugural-Dissertation 1968, Physiol. Inst. d.
Univ. Bern
64. Lüttgau, H.C. and Niedergerke, R.
J. Physiol. 143, 486, 1958
65. Lüttgau, H.C.
J. Physiol. 168, 679, 1963
66. Lüttgau, H.C.
"Electrophysiology of the Heart" 1964
67. Lüttgau, H.C.
J. Physiol. 178, 45, 1965
68. Lüttgau, H.C. and Oetliker, H.
J. Physiol. 194, 51, 1968

69. Marsh, B.B.
Nature, 167, 1065, 1951
70. Mc Namara, B.P., Murtha, F.F., Bergner, A.D.,
Robinson, E.M., Bender, C.W. and Wills, J.H.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 110, 232, 1954
71. Meeter, E.
J. Physiol. 144, 38, 1958
72. Milligan, J.V.
J. Gen. Physiol. 48, 841, 1965
73. Milligan, J.V. and Edwards, C.
J. Gen. Physiol. 48, 975, 1965
74. Mommaerts, W.F.H.M.
pers. Mitteilung
75. Murtha, E.F., Mc Namara, B.P., Edberg, L.J.,
Bergner, A.D. and Wills, J.H.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 115, 291, 1955
76. Nachmansohn, D.
Ergebn. Physiol. 48, 575, 1955
77. Nachmansohn, D.
Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity
Academic Press, New York, 1959
78. Nachmansohn, D.
Science, 134, 1962, 1961
79. Nachmansohn, D.
Proc. N. A. S. 61, 1034, 1968
80. Nagai, T. and Uchida, K.
Biochim. Biophys. Acta 44, 334, 1960
81. Natori, R.
Jikeikai Med. J. 1, 119, 1954

82. Natori, R. and Jsojima, C.
Jikeikai Med. J.9, 1, 1962
83. Niedergerke, R.
J. Physiol. 128, 12P, 1955
84. Peachey, L.D.
Proc. Int. Union Physiol. Sc. Vol. IV
85. Peachey, L.D.
J. Cell. Biol. 25, 209, 1965
86. Peachey, L.D.
Fed. Proc. 24, 1124, 1965
87. Podolsky, R.J.
Fed. Proc. 24, 1112, 1965
88. Porter, K.R. and Pallade, G.E.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 269, 1957
89. Portzehl, H.
Z. Naturforsch. 6b, 355, 1951
90. Portzehl, H.
Biochim. Biophys. Acta, 26, 373, 1957
91. Portzehl, H., Caldwell, P.C. and Ruegg, J.C.
Biochim. Biophys. Acta 79, 581, 1964
92. Portzehl, H., Zaoralek, P. and Grüder, A.
Pflügers Archiv 286, 44, 1965
93. Reichel, H.
Muskelpysiologie, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960
94. Rohr-Hadorn, I.
Helv. Physiol. Acta 19, 119, 1961

95. Sandow, A., Taylor, S.R. and Preiser, H.
Fed. Proc. 24, 1116, 1965
96. Szent-Györgyi, A.
Biol. Bull. 9b, 140, 1949
97. Schächtelin, G.
Pflügers Archiv, 273, 164, 1961
98. Schnel, H., Lorand, L., Schnel, R. and
Anderson, N.G.
J. Gen. Physiol. 48, 737, 1965
99. Schrader, G.
Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-
Ester; Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1963
100. Seraydarian, K. and Mommaerts, W.F.H.M.
Inform.Research Gr. 1 Nr. 304 v. 3.10.65
101. Ulbrecht, G. und Kruckenber, P.
Nature 206, 305, 1965
102. Ulbrecht, G.
Habilitationsschrift 1967
103. Ulbrecht M.
Biochim. Biophys. Acta 57, 438, 1962
104. Van der Kloot, W.G.
Comp. Biochem. Physiol. 17, 75, 1966
105. Walsh, R.R. and Deal, S.E.
Amer. J.Physiol. 197, 547, 1959
106. Waser, P.G. and Hadorn, I.
Bibl. anat. 2, 155, 1961
107. Waser, P.G.
Helv. Physiol. Acta 16, 171, 1958

108. Webb, G.D. and Walsh, R.R.
Fed. Proc. 20, 346, 1961
109. Weber, A.
Biochim. Biophys. Acta, 7, 214, 1951
110. Weber, A. and Winicur, S.
J. Biol. Chem. 236, 3198, 1961
111. Weber, A., Herz, R. and Reiss, I.
J. Gen. Physiol. 46, 679, 1963
112. Wilson, I.B.
J. Biol. Chem. 190, 111, 1951
113. Winegrad, S.
J. Gen. Physiol. 48, 455, 1965
114. Winegrad, S.
J. Gen. Physiol. 48, 997, 1965
115. Winegrad, S.
Fed. Proc. 24, 1146, 1965

Lebenslauf

Am 21. 9. 1938 wurde ich als Sohn des Textilkaufmannes Hermann Mayer und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Deppe, in Berlin geboren.

Von 1944 bis 1948 besuchte ich die Volksschule in Bühl am Alpsee und anschließend ein Jahr die Oberschule St. Maria Stern in Immenstadt. Von 1949 bis 1953 besuchte ich das Helmholtz-Gymnasium in Karlsruhe und darnach das Helmholtz-Gymnasium in Bielefeld, wo ich im März 1959 das Abitur ablegte. Vom 1. 4. 1959 bis 30. 9. 1960 Ableistung des Grundwehrdienstes und Reserveoffiziersausbildung bei der Bundeswehr. Im Wintersemester 1960/61 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Freiburg. Nach dem Vorphysikum setzte ich mein Studium an der Universität München fort, wo ich im Wintersemester 1962/63 das Physikum und am 24. 6. 1966 das Staatsexamen bestand.

Vom 1. 7. 1966 bis 31. 8. 1967 arbeitete ich als Medizinalassistent im Ev. Johannes-Krankenhaus in Bielefeld auf der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung (Chefarzt Prof. Dr. med. H. Noack), der Chirurgischen Abteilung (Chefarzt Prof. Dr. med. Eysholdt) und der Anaesthesie-Abteilung (Chefarzt Dr. med. D. Weber). Vom 1. 9. 1967 bis 30. 6. 1968 war ich auf der inneren Abteilung

des Kreiskrankenhauses Schötmar (Chefarzt Dr. med. E. Kruelkord) tätig. Am 1. 7. 1968 erhielt ich die Approbation als Arzt und trat als Sanitätsoffizier in die Bundeswehr ein.

Seither arbeite ich unter Leitung von Oberstarzt Priv. Doz. Dr. G. Ulbrecht im Physiologischen Institut der Universität München.

